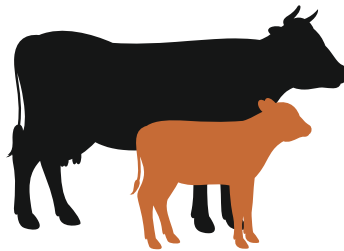


Monika Mewes-Beyer

Untersuchungen zur Assoziation zwischen
Alloantikörpern bei Rindern und der
Bovinen Neonatalen Panzytopenie



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

**Untersuchungen zur Assoziation zwischen
Alloantikörpern bei Rindern und
der Bovinen Neonatalen Panzytopenie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Monika Mewes-Beyer (geb. Beyer)

Tierärztin aus Coesfeld

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Bauerfeind
Prof. Dr. Sven König

Prüfer: Prof. Dr. Klaus Doll

Tag der Disputation: 4. Dezember 2018

Für meine Eltern und Julian

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	vii
Veröffentlichungen	x
I Einleitung	1
II Schrifttum	4
1 Die Bovine Neonatale Panzytopenie	4
1.1 Definition der Erkrankung	4
1.2 Epidemiologie	4
1.3 Symptome und Verlauf	7
1.4 Labordiagnostische Parameter	9
1.5 Pathologisch-anatomische und histopathologische Befunde	11
1.6 Ätiologie und Pathogenese	13
1.6.1 Nachweis von Allo-AK bei Bluter-Müttern und BNP-Kälbern	13
1.6.2 Zusammenhang zw. Kolostrum und BNP	15
1.6.3 Reproduktion von BNP mit Kolostrum, Serum und Immunglobulin- präparaten	16
1.6.4 Theorien zur Pathogenese	17
1.6.5 Rolle des Impfstoffs PregSure® BVD	22
1.6.6 Das MHC I-Molekül als potentiell ursächliches Allo-Antigen	24
1.6.7 Andere Oberflächenmoleküle als potentiell ursächliche Antigene	27
1.6.8 Einfluss des in PregSure® BVD verwendeten Adjuvans und des Impfschemas	29
1.6.9 Weitere potentielle Einflussfaktoren auf den Verlauf der BNP	32
1.6.10 Ausschluss von infektiösen Ursachen, Vergiftungen und Erbkrankheiten ...	34
1.7 Therapie und Prophylaxe	38
2 Alloantikörper	39

2.1	Definition	39
2.2	Entstehung und Vorkommen	40
2.2.1	Alloantikörper beim Menschen	41
2.2.2	Alloantikörper beim Rind	42
2.3	Alloantikörper-vermittelte Erkrankungen beim Menschen	44
2.3.1	<i>Morbus haemolyticus neonatorum (hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN)</i>	44
2.3.2	Fetale/Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FAIT/NAIT)	46
2.3.3	Neonatale Alloimmunneutropenie (ANN) bzw. Fetale/ Neonatale Alloimmungranulozytopenie	49
2.4	Alloantikörper-vermittelte Erkrankungen beim Tier	51
2.4.1	Immunthrombozytopenie bei neugeborenen Ferkeln und Fohlen	51
2.4.2	Neonatale Isoerythrolyse der Equiden	52
2.4.3	Neonatale Isoerythrolyse der Rinder	54
III	Material und Methoden	56
1	Probengewinnung	56
1.1	Betriebsdaten	56
1.2	Spenderkälber	58
1.3	Probenmaterial	60
2	Verwendete Antikörper	61
3	BVDV-Neutralisationstest	62
4	Zellkulturmethoden	62
4.1	Zelllinien	62
4.2	Gewinnung und Vorbereitung der Testzellen	63
4.3	Durchflusszytometrische Tests auf Allo-reaktive Antikörper (DFZM-Allo-AK-Tests)	65
4.3.1	DFZM-Allo-AK _{Leuko} -Test	65
4.3.2	DFZM-Allo-AK _{Thrombo} -Test	65

4.3.3	DFZM-Allo-AK _{BL-3} -Test.....	66
4.3.4	DFZM-Allo-AK _{MDBK} -Test.....	66
4.3.5	Kompetitiver DFZM-Allo-AK _{MDBK} -Test	67
4.3.6	Auswertstrategie und Analyse.....	68
4.3.7	Bestimmung von Immunglobulinklassen und –subtypen der alloreaktiven Antikörper	72
4.4	Serumlangsamagglutinationstest (SLA-Test).....	72
4.5	Zytotoxizitätstest (MTT-Test).....	73
4.6	Apoptose- und Nekrosetest.....	78
4.7	Phagozytostest.....	82
4.7.1	Isolierung der mononukleären Leukozyten aus peripher entnommenen Blutproben (PBMC).....	82
4.7.2	Generierung von Mø-Kulturen.....	83
4.7.3	Identifizierung von Makrophagen anhand spezifischer Oberflächen- antigene.....	84
4.7.4	Testansatz.....	85
4.7.5	Auswertung.....	86
5	Statistische Auswertung	89
6	Verbrauchsmaterial und Lösungen.....	90
IV	Ergebnisse	91
1	Korrelation zwischen den mit DFZM-Allo-AK-Tests ermittelten Alloantikörpertitern	91
1.1	Korrelation bei Verwendung von Leukozyten aus verschiedenen Spenderkälbern.....	91
1.1.1	Korrelation bei Verwendung von Leukozyten sowie BL-3- und MDBK-Zellen	94
1.2	Gegenüberstellung der im Serumlangsamagglutinationstest und im DFZM -Allo-AK-Test erzielten Titer	95

2	Vorkommen von Alloantikörpern bei Kühen mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus	97
2.1	Alloantikörper in Serumproben	97
2.1.1	Ergebnisse im DFZM-Allo-AK-Test	97
2.1.1.1	Vergleich von 6 Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus.....	97
2.1.1.2	Alloantikörper bei PregSure® BVD-geimpften Kühen: Vergleich von BNP-Muttern und Nicht-BNP-Muttern.....	101
2.1.1.3	Einfluss des Alters auf den Anteil Alloantikörper-positiver Tiere unter den Kühen in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben.....	104
2.1.1.4	Korrelation der Allo-AK-Titer mit BVDV-Impftitern	106
2.1.2	Ergebnisse im Serumlangsamagglutinationstest.....	108
2.2	Alloantikörper in Kolostrumproben.....	109
3	Eigenschaften der Alloantikörper in Rinderserumproben	111
3.1	Wirkung auf bovine Zielzellen <i>in vitro</i>	111
3.1.1	Zytotoxizität	111
3.1.2	Induktion von Apoptose und Nekrose	116
3.1.3	Steigerung der Zytophagozytose durch Makrophagen.....	118
3.2	Kompetition von Alloantikörpern in Rinderserumproben mit MHC I-spezifischen, monoklonalen Antikörpern um die Bindung an MDBK-Zellen ...	120
3.3	Immunglobulinklasse und -subtyp	122
V	Diskussion	124
1	Etablierung und Evaluierung der Testmethoden zum Nachweis von Alloantikörpern	124
1.1	Nachweis BNP-assoziierter Alloantikörper mit der Durchflusszytometrie.....	124
1.2	Nachweis BNP-assoziierter Alloantikörper mit der Serumlangsamagglutination.....	128
2	Assoziation von Alloantikörpern in Serum- und Kolostrumproben mit der PregSure® BVD-Impfung	129
3	Alloantikörper bei den mit Bovidec® geimpften Kühen	134

4	Mögliche Mechanismen der Alloantikörper-Wirkung auf die bovinen Zielzellen	137
5	Immunglobulin-Klasse und –subtyp der PregSure® BVD-assoziierten Alloantikörper	142
6	MHC I-Spezifität der Alloantikörper	143
7	Schlussfolgerungen.....	144
VI	Zusammenfassung.....	147
VII	Summary.....	150
VIII	Literaturverzeichnis	153
	Anhang.....	172
	Tabellenverzeichnis	181
	Abbildungsverzeichnis	181
	Danksagung.....	184
	Erklärung.....	186

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
<i>ad</i>	auffüllen bis
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
AK	Antikörper
Allo-AK	Alloantikörper
APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BNP	Bovine Neonatale Panzytopenie
BTV	<i>Bluetongue</i> -Virus
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
BVDV	Bovine-Virusdiarrhoe-Virus
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CFSE	5-,6-Carboxy-fluorescein-diacetat-succinimidylester
DFZM	Durchflusszytometer
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FSC	engl.: <i>forward scatter</i>
g	Erdschwerebeschleunigung
h	Stunden
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
IFN β	Interferon- β

IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen
k. A.	keine Angabe
KWS	Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Justus-Liebig- Universität Gießen
LT	Lebenstag
M	Molarität (mol/l)
MFI	Mittlere relative Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
Mo	Monat
n	Anzahl unabhängiger Versuche
N ₂	Summenformel des molekularen Stickstoffs
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCV	engl.: <i>packed cell volume</i>

<i>p.n.</i>	<i>post natum</i>
PI	Propidiumiodid
Q	Quantil
r	Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
SSC	engl.: <i>side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

K. Doll, L. Wenzel, J. Francke, G. Reiner, H. Willems, N. Bauer, T. Rümenapf, F. Deutskens, H.J. Thiel, M. Reinacher, **M. Beyer**, S. Schillinger, P.S. Bridger, R. Bauerfeind (2012). Bovine Neonatale Pancytopenie. 6. Leipziger Tierärztekongress 19.-21.01.2012, Leipzig, Abstract in LBH: 6. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 3: S. 101 – 104.

K. Doll, P.S. Bridger, S. Schillinger, **M. Beyer**, L. Wenzel, J. Francke, H.J. Thiel, M. Reinacher, N. Bauer, R. Bauerfeind (2011): Investigations on the etiopathogenesis of Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP). European Buiatric Meeting, 12th Middle European Buiatric Congress, Pula, Croatia, 18.-22.05.2011, Abstract in Book of Proceedings, Veterinarska Stanica 42, Supplement 1: S. 8-9.

K. Doll, L. Wenzel, J. Francke, G. Reiner, H. Willems, N. Bauer, T. Rümenapf, F. Deutskens, H.J. Thiel, M. Reinacher, **M. Beyer**, S. Schillinger, P.S. Bridger, R. Bauerfeind (2013): Bovine Neonatale Pancytopenie – Geschichte einer außergewöhnlichen Krankheit – Teil 1: Klinik, Labordiagnostik und Sektionsbefunde, Prakt. Tierarzt 94: S. 236-245.

K. Doll, L. Wenzel, J. Francke, G. Reiner, H. Willems, N. Bauer, T. Rümenapf, F. Deutskens, H.J. Thiel, M. Reinacher, **M. Beyer**, S. Schillinger, P.S. Bridger, R. Bauerfeind (2013): Bovine Neonatale Pancytopenie – Geschichte einer außergewöhnlichen Krankheit – Teil 2: Epidemiologie, Ätiopathogenese, Therapie und Prophylaxe. Prakt. Tierarzt 94: S. 436-443.

Vorträge

M. Beyer (2012): Bovine Neonatal Pancytopenia: hints towards a causative role of vaccine-induced alloreactive antibodies. Current Topics in Infection Biology, GGL Curriculum, 20.01.2012, Gießen.

Monika Mewes-Beyer wurde gefördert durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Förderung dieser Doktorarbeit erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Förderkennzeichen 2809HS025

I Einleitung

Die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine in Europa seit Ende 2006 beobachtete, oft tödlich verlaufende Krankheit bei neugeborenen Kälbern des Hausrinds. Das klinische Bild der BNP ist geprägt von einer stark erhöhten Blutungsneigung. Das Blutbild betroffener Kälber weist eine extreme Thrombo- und Leukozytopenie auf. Histopathologischer Hauptbefund ist eine massive und teilweise irreversible Knochenmarksschädigung. Bis einschließlich August 2011 wurden in Deutschland ca. 3.500 Fälle registriert (gemeldete Fälle laut www.pei.de, Stand Mai 2012). Die Ursache der BNP war anfangs unbekannt. In Verdacht gerieten zunächst sowohl infektiöse als auch nicht-infektiöse Ursachen. Unter den infektiösen Ursachen ist zuerst das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV Typ 2) zu nennen, welches eine hämorrhagische Diathese beim Kalb mit Rückgang der Thrombozyten- und Leukozytenzahlen hervorrufen kann (Corapi *et al.* 1989, Bolin and Ridpath 1992, Stoffregen *et al.* 2000). Dabei handelt es sich um Infektionen mit nicht-zytopathogenen BVD-Viren vom Genotyp 2, die eine gesteigerte Virulenz aufweisen und in der Lage sind, das sogenannte „*Hemorrhagic Syndrome*“ auszulösen (Walz *et al.* 1999, Stoffregen *et al.* 2000). Auch die Viren der *Epizootic Haemorrhagic Disease* (EHDV) und der Blauzungkrankheit (BTV) wurden als Ursachen für BNP diskutiert. Untersuchungen von an BNP erkrankten und an BNP verstorbenen Kälbern auf diese Infektionserreger verliefen allerdings negativ (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010). Auch Circovirusinfektionen wurden in Betracht gezogen, da sie beim Geflügel eine BNP-ähnliche Erkrankung hervorrufen, die sog. infektiöse Anämie der Küken. Die von Kappe *et al.* (2010) beschriebenen Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Infektionen mit Circoviren und BNP wurden in anderen Untersuchungen jedoch nicht bestätigt (Mueller *et al.* 2009, Kappe *et al.* 2010, Willoughby *et al.* 2010). Außerdem ist bereits aus einer deutschen Studie von 1995 durch den Nachweis von virusspezifischen Antikörpern bei Rindern bekannt, dass Circovirusinfektionen in der Rinderpopulation endemisch sind (Tischer *et al.* 1995). Zudem wurde bereits lange vor dem ersten dokumentierten BNP-Fall ein PCV-Typ 2-ähnliches Virus aus den Lungen von abortierten Rinderfeten und pneumoniekranken Kälbern isoliert (Nayar *et al.* 1999).

Zu den nicht-infektiösen Ursachen, die als Auslöser für BNP diskutiert wurden, zählten toxische Substanzen, Erbkrankheiten und (auto-) immunpathologische Prozesse. Diverse Giftstoffe natürlichen Ursprungs und auch die Aufnahme von verschiedenen Chemikalien und Arzneimitteln können zu BNP-ähnlichen Krankheitsbildern bei Rindern führen. Es konnte aber keine der verdächtigten

Substanzen bei BNP-Kälbern bzw. in den Futterproben nachgewiesen werden (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010). Auch Untersuchungen von Futterproben auf Zytotoxizität ergaben negative Resultate (Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010). Zudem ist die Anwendung von einigen Stoffen heute verboten bzw. nicht mehr gebräuchlich, was sie als Ursache der BNP unwahrscheinlich macht. So sind Furazolidon und Chloramphenicol bei lebensmittelliefernden Tieren EU-weit verboten, und Trichloräthylen wird schon seit längerer Zeit nicht mehr zur Extraktion von Sojaschrot eingesetzt (Stöber 2002).

Eine rein hereditäre Ursache erschien unwahrscheinlich, da die Erkrankung bei allen in größerem Umfang gehaltenen Rassen und bei Kälbern beiderlei Geschlechts auftritt (Kappe *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011).

Aufgrund des klinischen Bildes und wegen der zytologischen und (histo-) pathologischen Befunde vermutete man zu Beginn der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen, dass der BNP-Pathogenese ein immunpathologisches Geschehen zugrunde lag (Bridger *et al.* 2011). Mehrere Veröffentlichungen haben gezeigt, dass BNP in gesunden Kälbern durch die Gabe von Kolostrum von BNP-Muttertieren experimentell ausgelöst werden kann (Friedrich *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011, Henniger *et al.* 2014). Weitere Untersuchungen belegen, dass das Serum von BNP-Muttertieren Alloantikörper (Allo-AK) gegen Leukozyten von neugeborenen Kälbern enthält (Bridger *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011), die mit dem Kolostrum auf das Neugeborene übertragen werden können. Derartige Allo-AK könnten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der BNP spielen.

Auffällig ist, dass nahezu alle BNP-Fälle in Herden beobachtet wurden, in denen gegen eine Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) geimpft wurde (Smolenaars and Mars 2009, Bell *et al.* 2009a, Pardon *et al.* 2009a, Friedrich *et al.* 2009b). Da ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Einsatz der BVDV-Inaktivat-Vakzine PregSure® BVD (Fa. Pfizer) und dem Auftreten von BNP bei Kälbern als wahrscheinlich angenommen wurde (Friedrich *et al.* 2011, Kracke 2011), nahm der Hersteller PregSure® BVD bereits 2010 vom Markt (Anonym 2010a).

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren, den epidemiologischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von BNP-Fällen und Kühen mit Allo-AK in ihrem Blutkreislauf näher zu beleuchten und die nachgewiesenen Allo-AK, vor allem bezüglich ihrer Wirkung auf die Zielzellen, eingehender zu charakterisieren. Hierzu wurde die am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen entwickelte, Durchflusszytometrie-basierte Methode zum Nachweis von Allo-AK gegen Leukozyten

in Rinder-Serumproben (Bridger *et al.* 2011) weiter entwickelt. Es sollte zunächst ein standardisiertes Testverfahren zur Bestimmung des Allo-AK-Titers im Serum etabliert werden, welches mit wenig Aufwand durchführbar ist. Dieser Test war dann in einer Fall-Kontroll-Studie einzusetzen, um das Vorkommen derartiger Allo-AK bei weiblichen Rindern in Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus und unterschiedlicher BNP-Historie zu untersuchen.

II Schrifttum

1 Die Bovine Neonatale Panzytopenie

1.1 Definition der Erkrankung

Die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) ist definiert als eine Erkrankung junger Kälber, bei der die folgenden Befunde zu erheben sind (Scholes 2009, Friedrich *et al.* 2009c, Pardon *et al.* 2010, Friedrich *et al.* 2011):

- Alter zum Zeitpunkt der Erkrankung ≤ 4 Wochen
- multiple äußere und innere Blutungen
- Thrombozytopenie ($< 200 \times 10^9$ Thrombozyten/L)
- Leukopenie ($< 3 \times 10^9$ Leukozyten/L bzw. $< 4 \times 10^9$ Leukozyten/L)
- Panmyelophthise des Knochenmarks.

Als weiteres Kriterium wurde von einigen Autoren die Abwesenheit von BVDV-Antigen angeführt (Friedrich *et al.* 2009c, Pardon *et al.* 2010). 2011 stellten Friedrich *et al.* allerdings fest, dass bezüglich der Anwesenheit von BVDV als Ausschlusskriterium keine Einigkeit besteht (Friedrich *et al.* 2011). Weiterhin wiesen sie darauf hin, dass nicht in allen Fällen Blutungen bei der klinischen Untersuchung sichtbar sein müssen. Inzwischen gilt es als gesichert, dass subklinische Fälle existieren (Friedrich *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2010, Witt *et al.* 2011). Diese Kälber sind klinisch unauffällig, aber ihr Blutbild weist eine erniedrigte Leukozyten- und/oder Thrombozytenzahl auf.

1.2 Epidemiologie

Ende 2006 wurde bei neugeborenen Kälbern in Deutschland erstmals eine bis dato unbekannte und oft tödlich verlaufende Krankheit beobachtet. In den folgenden Jahren trat diese hämorrhagische Diathese unbekannter Ursache bei Kälbern vermehrt auf (Friedrich *et al.* 2009a, Friedrich *et al.* 2009e). Diese Beobachtungen stimmten mit den Berichten aus anderen europäischen Ländern überein. Vergleichbare Fälle von hämorrhagischen Diathesen kamen demnach seit 2007 auch in Frankreich, dem Vereinigten Königreich, Irland, den Niederlanden, Belgien, Luxemburg, Italien, Spanien, Polen und Ungarn gehäuft vor (Anonym 2009a, Armengol *et al.* 2010, Sanchez-Miguel *et al.* 2010, Bell 2011, Kracke 2011, Kasonta *et al.* 2012). Unter Tierhaltern und in den Boulevardmedien wurde das Krankheitsbild meist als

„Blutschwitzen“ und die betroffenen Kälber als „Bluterkälber“ bezeichnet. In der Fachliteratur wurde das Syndrom zunächst als „Hämorrhagische Diathese“ oder „Hämorrhagisches Diathese-Syndrom“ bezeichnet. Im Dezember 2009 einigten sich die Buiatriker im European Buiatrics Forum in Marseille („*Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves*“, 2. Dez. 2009 in Marseille) auf den Fachbegriff „Bovine Neonatale Panzytopenie“ (BNP) (Bell 2011, Friedrich *et al.* 2011).

Epidemiologische Nachforschungen ergaben, dass nahezu alle BNP-Fälle bei Kälbern in Herden beobachtet wurden, in denen die Kühe gegen eine Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) geimpft worden waren (Smolenaars and Mars 2009, Bell *et al.* 2009a, Pardon *et al.* 2009a, Friedrich *et al.* 2009b). Auffällig war zudem, dass in Ländern, die frei von BVD sind oder in denen nicht gegen BVD geimpft wird, wie der Schweiz, Österreich und Skandinavien, keine BNP-Fälle beobachtet wurden (Friedrich *et al.* 2009e, Bell 2011, Friedrich *et al.* 2011). Aktuelle Veröffentlichungen belegten einen Zusammenhang zwischen der Vermarktung der BVDV-Inaktivatvakzine PregSure® BVD (Fa. Pfizer) und dem Auftreten von BNP (Kasonta *et al.* 2012, Lambton *et al.* 2012). BNP ist demnach nur in Ländern aufgetreten, in denen PregSure® BVD vermarktet wurde (Kasonta *et al.* 2012).

PregSure® BVD ist in Deutschland seit 2004 kommerziell vertrieben worden, seit 2005 EU-weit (Anonym 2010a). Außerhalb Europas wurde PregSure® BVD nur in wenigen Ländern auf den Markt gebracht, darunter Neuseeland (Anonym 2011c). Mitte August 2011 wurde der erste BNP-Verdachtsfall in Neuseeland bekannt, wo der Impfstoff seit 2008 vermarktet worden war (Anonym 2011c). In Deutschland lagen ebenfalls etwa 3 Jahre zwischen der Markteinführung des Impfstoffes und den Berichten über erste Fälle von BNP. Sollte PregSure® BVD kausal in die Pathogenese der BNP involviert sein, dann soll die zeitliche Verzögerung bis zum Auftreten der Erkrankung dadurch zu erklären sein, dass mehrere Wiederholungsimpfungen (z.B. gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Impfschema mit einer Grundimmunisierung bestehend aus 2 Impfungen und (mehreren) Boosterimpfungen) nötig sind, um schließlich die Erkrankung BNP auszulösen (Kasonta *et al.* 2012).

Ab März 2010 verzichtete Pfizer auf die Vermarktung von PregSure® BVD in Deutschland, am 16. Juli 2010 folgte der Ausschuss für Tierarzneimittel (CVMP) bei der Europäischen Arzneimittelagentur EMA der Empfehlung des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI), die Zulassung ruhen zu lassen (Anonym 2011b). Schließlich verzichtete das Unternehmen Pfizer auf die Zulassung des Impfstoffs am 30. August 2011 (Anonym 2011a). Auch in Neuseeland stoppte Pfizer die Vermarktung von PregSure® BVD

umgehend und rief ausgelieferte Chargen zurück, nachdem dort ebenfalls Verdachtsfälle von BNP aufgetreten waren (MAF 2011, Anonym 2011a). Eine Studie bestätigte später, dass es sich bei den Verdachtsfällen von hämorrhagischer Diathese bei Kälbern in Neuseeland tatsächlich um BNP-Fälle handelte (Kasonta *et al.* 2014).

Bis einschließlich August 2011 wurden europaweit über 5.500 BNP-Fälle bei Kälbern gemeldet, davon ca. 3.500 Fälle in Deutschland (www.pei.de, Stand Mai 2012). Seit dem Vermarktungsstopp von PregSure® BVD 2010 in Deutschland traten über 1.600 weitere BNP-Fälle auf. Viele BNP-Muttertiere brachten in späteren Trächtigkeiten weitere Kälber zur Welt, die an BNP erkrankten, auch wenn offiziell keine erneute PregSure® BVD-Impfung erfolgt war (Cußler 2011, Benedictus *et al.* 2016).

BNP tritt insgesamt betrachtet relativ selten auf (Bastian *et al.* 2011, Bell 2011, Foucras *et al.* 2011). Für die Europäische Union wurde die BNP-Inzidenz zwischen 2004 und 2009 auf 16 Fälle je 100.000 verimpfte Einzeldosen an PregSure® BVD geschätzt (Anonym 2010b). Sie scheint damit im Bezug zu der Gesamtzahl von über 13 Millionen verkauften Impfstoffdosen (Anonym 2010a) niedrig zu sein (Lambton *et al.* 2012).

Die Gesamtinzidenz der BNP ist auch in Deutschland mit etwa 3 Fällen je 1.000 verimpften Einzeldosen an PregSure® BVD relativ niedrig, obwohl hier bisher die meisten BNP-Fälle aufgetreten sind (Bastian *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011). Allerdings gibt es große regionale Unterschiede sowohl zwischen verschiedenen EU-Ländern und als auch innerhalb eines Landes (Kasonta *et al.* 2012, Lambton *et al.* 2012). So beträgt die Inzidenz in Bayern 99 BNP-Fälle pro 100.000 verkauften Impfdosen PregSure® BVD, dagegen in Niedersachsen nur 6 Fälle (Kasonta *et al.* 2012). In von BNP-betroffenen Herden erkrankten normalerweise nicht mehr als 5 - 10 % der geborenen Kälber (Bastian *et al.* 2011, Bell 2011, Foucras *et al.* 2011).

BNP tritt bei Kälbern verschiedener Rassen wie Deutsches Fleckvieh, Deutsche Holstein, Deutsches Braunvieh, Simmentaler, Charolais, Weißblaue Belgier sowie bei Kreuzungskälbern auf (Doll *et al.* 2009, Pardon *et al.* 2009a, Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Bell 2011). Dabei sind sowohl Milchvieh- als auch Mastviehherden betroffen (Bell 2011). Es erkrankten neugeborene Kälber im Alter von wenigen Tagen bis zu 4 Wochen, die meisten Krankheitsfälle traten in der 2. und 3. Lebenswoche auf (Corbière *et al.* 2009, Smolenaars and Mars 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Bell 2011, Buck *et al.* 2011). Das Durchschnittsalter bei der tierärztlichen Vorstellung der BNP-

Patienten betrug 14 - 16 Tage (7 - 28 Tage) (Smolenaars and Mars 2009, Pardon *et al.* 2010).

BNP kann sowohl bei Kälbern von Färsen als auch bei Kälbern von Kühen auftreten (Bell 2011, Demasius *et al.* 2014). Es wurde beschrieben, dass einzelne Kühe mehrfach BNP-Kälber zur Welt brachten, aber nicht zwingend nach aufeinanderfolgenden Trächtigkeiten (Pardon *et al.* 2010). Diese unterschiedliche BNP-Empfänglichkeit von Kälbern derselben Mutter lässt einen Einfluss von genetischen Faktoren in der Pathogenese dieser Erkrankung vermuten (Bridger *et al.* 2011, Jones *et al.* 2013, Demasius *et al.* 2014). In von BNP betroffenen Herden scheinen die Kühe klinisch gesund zu sein und normal abzukalben. Es treten jedenfalls keine gesteigerten Abortraten oder Fruchtbarkeitsstörungen im Zusammenhang mit BNP auf (Bell *et al.* 2010b). Männliche und weibliche Kälber erkranken außerdem gleich häufig (Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010).

1.3 Symptome und Verlauf

Das auffälligste Anzeichen der BNP ist die stark erhöhte Blutungsneigung, die sich bei erkrankten Kälbern als hämorrhagische Diathese manifestiert (Doll *et al.* 2009, Anonym 2009a, Friedrich *et al.* 2009a, Friedrich *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011). Als klinische Anzeichen treten typischerweise spontane Hautblutungen, Nachblutungen nach Injektionen, dem Einziehen von Ohrmarken oder Enthornung, Petechien und/oder Ekchymosen an den sichtbaren Schleimhäuten sowie Blutbeimengungen (Meläna) im Kot auf (Doll *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009a, Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011, Buck *et al.* 2011). Eine erhöhte Körpertemperatur bis hin zu hohem, therapieresistentem Fieber, wurde ebenfalls beschrieben (Friedrich *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011). Andere Untersuchungen legen allerdings nahe, dass Fieber kein charakteristisches Symptom für BNP ist, sondern vermutlich durch Infektionen mit viralen oder bakteriellen Erregern verursacht ist, deren Auftreten durch die extreme Leukozytopenie begünstigt wird (Doll *et al.* 2009, Kappe *et al.* 2010, Friedrich *et al.* 2011). Teilweise zeigen betroffene Kälber auch Symptome von typischen Neugeborenenenerkrankungen wie Diarrhoe oder Pneumonie oder eine Störung des Allgemeinbefindens mit Fieber ohne erkennbare Ursache (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Buck *et al.* 2011). In einigen dieser Fälle fiel die Blutungsneigung erst durch vermehrtes Nachbluten nach Injektionen auf. An den betroffenen Stellen können sich Hämatome entwickeln (Friedrich *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2010).

Kälber, die später an BNP erkrankten, erschienen *post partum* zunächst vital und klinisch unauffällig (Doll *et al.* 2009, Kappe *et al.* 2010). Nach der Kolostrumaufnahme wurde von Doll *et al.* (Doll *et al.* 2009) bei einigen Kälbern ein gedämpftes Verhalten beobachtet, allerdings normalisierte sich der Allgemeinzustand innerhalb der nachfolgenden 24 h wieder. Betroffene Kälber wiesen oft einen guten Wachstums- und Ernährungszustand auf und waren vorberichtlich vor dem Ausbruch der BNP nicht erkrankt (Bell 2011).

Meistens treten die ersten Blutungen in der 2. oder 3. Lebenswoche auf (Doll *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010). In besonders schweren Fällen kann sich die gesteigerte Blutungsneigung aber schon ab dem 2. Lebenstag zeigen (Doll *et al.* 2009). Das Allgemeinbefinden der erkrankten Kälber kann in den ersten Tagen noch unauffällig bleiben (Doll *et al.* 2009, Pardon *et al.* 2010). Im weiteren Verlauf der Erkrankung entwickeln Kälber mit schwerer hämorrhagischer Diathese ein stark gestörtes Allgemeinbefinden und sterben in den meisten Fällen innerhalb von 1 – 15 Tagen nach Krankheitsbeginn oder werden wegen schlechter Prognose (massiver Blutverlust oder zusätzlich aufgetretene Infektionen) euthanasiert (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011). In der Literatur werden trotz Therapieversuchen Letalitätsraten von über 90 % angegeben (Pardon *et al.* 2010, Bell 2011). Eine Studie über die verschiedenen Todesursachen bei an BNP erkrankten Kälbern zeigte, dass blutungsbedingte Anämie die häufigste Todesursache ist. Außerdem wurde bestätigt, dass BNP die Letalität von typischen Neugeboreneninfektionen wie Pneumonien, Enteritiden und Septikämien erhöht (Henniger *et al.* 2014). Nur etwa 10 % der klinisch manifest erkrankten Kälber überlebten die Erkrankung und erholten sich wieder (Doll *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011). Bei diesen Kälbern ging die Rekonvaleszenz mit der spontanen Erhöhung der zuvor pathologisch niedrigen Blutzellwerte einher (Doll *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Buck *et al.* 2011).

Neben den schweren klinischen Verläufen von BNP kommen auch subklinische Fälle vor, die nur durch gezielte hämatologische Untersuchungen festgestellt werden können und bei denen die Kälber keinerlei klinische Krankheitserscheinungen zeigen (Klemm 2010, Pardon *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011, Witt *et al.* 2011, Bell *et al.* 2014). Bell *et al.* ermittelten anhand von hämatologischen Screenings aller in einer Abkalbesaison geborenen Kälber in einem Betrieb neben den offensichtlichen klinischen BNP-Fällen subklinische BNP bei 15 % der klinisch unauffälligen Kälber (Bell *et al.* 2014). In dieser Studie gab es keine Hinweise auf eine erhöhte Mortalität

oder Wachstumseinbußen, die Autoren schließen allerdings nicht aus, dass subklinische BNP unter bestimmten Umständen einen Einfluss auf die Gesundheit und/oder Leistung von betroffenen Kälbern haben kann. Demasius *et al.* konnten ebenfalls subklinische Fälle von BNP in ihrer Studienpopulation ermitteln, diese traten aber nicht mit der von anderen Autoren beschriebenen hohen Inzidenz auf (Demasius *et al.* 2014).

An 7 Kälbern, die eine experimentell induzierte BNP (subklinischer Verlauf bei 5 Tieren, Petechien und Hämaturie bei 2 Tieren) überlebt hatten, wurde die Nierenfunktion untersucht, um zu klären, ob Kälber als Folge der BNP dauerhafte Nierenschädigungen zurückbehalten. In den Parametern der Nierenfunktion unterschieden sich die 7 untersuchten BNP-Kälber jedoch nicht von gesunden Kälbern gleichen Alters (Henniger *et al.* 2013).

1.4 Labordiagnostische Parameter

Charakteristische Veränderungen des Blutbilds sind in der Initialphase der BNP eine Thrombozytopenie ($< 200 \times 10^9$ Thrombozyten/L) und eine Leukopenie ($< 4 \times 10^9$ Leukozyten/L) (Bauer *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009c, Pardon *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011). Die Blutbild- und Knochenmarksbefunde sind bei Kälbern, die später an BNP erkranken, *post partum* vor der Aufnahme von Kolostrum unauffällig (Bauer *et al.* 2009, Doll *et al.* 2009, Klemm 2010, Bridger *et al.* 2011, Friedrich *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011). Erst nach der Kolostrumaufnahme sinken die Thrombozyten- und Leukozytenzahlen innerhalb der ersten 3 – 6 Lebensstunden drastisch ab (Bauer *et al.* 2009, Bridger *et al.* 2011, Friedrich *et al.* 2011). Auch Schröter *et al.* (Schröter *et al.* 2011) beobachteten in ihren Versuchen zur Reproduzierbarkeit der BNP über die Verabreichung von Kolostrum bei allen Versuchskälbern einen starken Abfall der Thrombozytenzahlen ($< 300 \times 10^9$ Thrombozyten/L) innerhalb der ersten beiden Lebenstage. Bei allen Kälbern, welche Symptome der BNP entwickelten, trat neben der Thrombopenie auch eine Leukopenie auf. Die Leukopenie war aber im Auftreten variabler und trat nicht immer zeitgleich mit der Thrombopenie auf.

Die weitere Entwicklung der Blutwerte korreliert mit dem klinischen Verlauf und dem Schweregrad der BNP. Charakteristisch ist die zeitliche Entwicklung der Thrombozytenzahl bei letaler BNP: Nach dem initialen Abfall steigen die Werte zunächst über einige Tage wieder an, bevor sie final massiv abstürzen (Friedrich *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011). Friedrich *et al.* vermuten, dass der initiale starke Abfall der

Thrombozytenzahl durch eine periphere Zerstörung der Zellen und nicht durch eine Schädigung des Knochenmarks bedingt ist (Friedrich *et al.* 2011). Die Veränderung der Leukozytenzahlen über die Zeit und das Auftreten einer Leukopenie sind im Vergleich zu den Thrombozyten variabler. Bei einem schweren Verlauf der BNP tritt bedingt durch die Knochenmarksschädigung im Endstadium eine irreversible, hochgradige Leukopenie auf (Pardon *et al.* 2010, Buck *et al.* 2011, Friedrich *et al.* 2011). Die Leukopenie betrifft dabei Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gleichermaßen (Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Friedrich *et al.* 2011). Auch in anderen Untersuchungen wurde stets eine hochgradige Leukopenie gefunden, die auf einer absoluten Neutropenie und Lymphopenie beruhte. Angaben zu den Monozyten wurden hier nicht gemacht (Bauer *et al.* 2009, Bell 2011).

Die Morphologie der verbliebenen Leukozyten und Thrombozyten bei BNP-Kälbern ist unauffällig und weckt jedenfalls keinen Verdacht, dass ihre Funktion gestört ist (Friedrich *et al.* 2009b, Buck *et al.* 2011). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass entweder die Zellbildung im Knochenmark gestört ist und/oder Zellen vermehrt abgebaut bzw. verbraucht werden. Demnach würde es sich um eine echte Zytopenie und nicht um eine Funktionsstörung (Zytopathie) handeln.

Die Erythrozytenzahlen bzw. Hämatokritwerte können auch bei einem schweren, letalen Verlauf der BNP über lange Zeit innerhalb des Referenzbereiches liegen (Mueller *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009e, Schröter *et al.* 2011). Bei großen Blutverlusten entwickelt sich eine hämorrhagische Anämie mit normozytärem, normochromem Zellbild (Friedrich *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011). Diese Zellmorphologie ist charakteristisch für eine nicht-regenerative Anämie, bei der aufgrund einer Knochenmarksschädigung die Produktion von Erythrozytenvorläuferzellen ausbleibt (Rossow 1995). Entsprechende Veränderungen im Blutbild von BNP-Kälbern sind also als Folge der Knochenmarksschädigung zu deuten. Ihr zeitlicher Verlauf wird durch die unterschiedliche Lebensdauer der jeweils betroffenen Blutzellpopulationen erklärt (Kappe *et al.* 2010, Bell 2011, Witt *et al.* 2011, Deutszens 2012). Die Lebensdauer von Granulozyten beträgt nur wenige Stunden, die von Thrombozyten beträgt beim Kalb etwa 9 - 10 Tage (Mizuno *et al.* 1959, Loesch *et al.* 2000, Paape *et al.* 2003, Valli 2007, Deutszens 2012). Zur durchschnittlichen Lebensdauer von Erythrozyten beim Kalb enthält die Literatur unterschiedliche Angaben. Sie beträgt demzufolge etwa 60 bzw. 110 - 120 Tage (Mizuno *et al.* 1959, Valli 2007, Bell 2011). Dies passt zu der Beobachtung, dass bei an BNP erkrankten Kälbern zuerst die Granulozyten- und Thrombozytenzahlen sinken. Der zunächst

geringe Schweregrad und das verzögerte Auftreten der aplastischen Anämie hängen von der im Vergleich zu den anderen Blutzelltypen längeren Lebensdauer der Erythrozyten ab. Die Erythrozytenwerte fallen deshalb oft erst im Endstadium der Erkrankung ab (Kappe *et al.* 2010, Bell 2011, Buck *et al.* 2011, Witt *et al.* 2011).

Über die plasmatischen Gerinnungsparameter bei BNP-Kälbern findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben: In der Studie von Bauer *et al.* lagen die Werte für die Prothrombinzeit (PT), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Fibrinogen im gesamten Studienzeitraum bei den von BNP betroffenen Kälbern im physiologischen Referenzbereich der Kälber dieses Alters (Bauer *et al.* 2009). Auch in weiteren Untersuchungen fand sich kein Hinweis auf eine systemische, plasmatisch-bedingte Blutgerinnungsstörung (Corbière *et al.* 2009, Bell *et al.* 2009c). In anderen Untersuchungen war die PT dagegen immer, und die aPTT in 25 % der Fälle leicht verlängert (Pardon *et al.* 2010). Diese Autoren fanden bei manchen Patienten auch erhöhte Fibrinogenwerte (Pardon *et al.* 2010). Es könnten demnach bei der BNP neben den Thrombozyten auch plasmatische Gerinnungsfaktoren von krankhaften Veränderungen betroffen sein. Von den anderen chemischen Parametern des Blutes war bei BNP-Kälbern nur die Hypoproteinämie auffällig. Der Abfall der Plasmaproteinkonzentration tritt vermutlich als Folge des Blutverlustes auf (Pardon *et al.* 2010).

Die Befunde deuten insgesamt darauf hin, dass die Blutbildveränderungen bei BNP auf einer Zerstörung der Blutvorläuferzellen im Knochenmark beruhen, und/oder auf einer gleichzeitigen Zerstörung von Blutzellen in der Peripherie (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Bell 2011, Buck *et al.* 2011, Friedrich *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011).

1.5 Pathologisch-anatomische und histopathologische Befunde

Bei den pathologisch-anatomischen Befunden stehen bei BNP-Kälbern kleinere und größere Blutungen im Vordergrund. Beschrieben wurden Petechien, Ekchymosen und akute Hämorrhagien in mehreren Organen und Geweben (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Buck *et al.* 2011). Als Folge der starken Blutverluste sind die Körper der Kälber oft blass und anämisch (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010). Darüberhinaus wurde häufig eine hochgradige katarrhalische Enteritis, teilweise mit Blutbeimengungen im Kot bzw. Blutungen in das Darmlumen, festgestellt (Friedrich *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2010, Buck *et al.* 2011).

Neben diesen für die BNP charakteristischen Befunden treten bei einigen BNP-Kälbern zusätzliche Erkrankungen auf, wie z.B. Pneumonien oder andere entzündliche Veränderungen (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010). Ursache sind vermutlich Infektionen, welche durch die mit der Leukopenie und Lymphopenie einhergehenden Immunschwäche begünstigt werden (Doll *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Bell 2011).

Histopathologisch ist eine extreme Zellarmut des hämatopoetischen Gewebes im Knochenmark der charakteristische Hauptbefund bei BNP-Kälbern. Im Sinne einer Panmyelophthase betrifft diese Zellarmut alle hämatopoetischen Zellreihen inklusive der Megakaryozyten (Bauer *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Buck *et al.* 2011).

Vor der Kolostrumaufnahme ergaben zytologische Untersuchungen von Knochenmarksaspiraten ein physiologisches Ergebnis (Bauer *et al.* 2009). Erst einige Zeit nach der Aufnahme von Kolostrum kommt es in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium zu einer mittel- bis hochgradigen Hypoplasie aller Zellreihen (Bauer *et al.* 2009, Pardon *et al.* 2010), die schließlich in der für die BNP charakteristischen Panmyelophthase resultiert (Scholes 2009, Friedrich *et al.* 2009c, Kappe *et al.* 2010, Bell 2011). In einzelnen Fällen wurden bei der zytologischen Untersuchung von Knochenmark auch aktivierte Makrophagen (Makrophagen mit einem runden bis ovalen, exzentrisch gelegenen Kern und viel Zytoplasma mit Vakuolen) und Makrophagen mit phagozytierten Erythrozyten und Vorläuferzellen (Zytophagie) beobachtet (Bauer *et al.* 2009, Pardon *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011).

Manchmal wurden im Knochenmark von BNP-Kälbern noch kleine Restbezirke an hämatopoetischem Gewebe gefunden (Kappe *et al.* 2010). In diesen Bereichen zeigten sich gelegentlich fokale Degeneration und Apoptose von Blutzellvorläuferzellen. Auch Friedrich *et al.* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass der Schweregrad der Knochenmarksschäden bei BNP unterschiedlich sein kann (Friedrich *et al.* 2011).

Die BNP geht häufig auch mit Veränderungen in lymphatischen Geweben einher. So konnten in einer Studie bei 43 % der 56 untersuchten BNP-Kälber Läsionen in lymphatischen Organen nachgewiesen werden (Kappe *et al.* 2010). Diese unter dem Begriff „Lymphatische Depletion“ zusammengefassten Veränderungen präsentierten sich als vermehrt apoptotische Lymphozyten in Lymphfollikeln oder Zellarmut in Milz und Lymphknoten bei geringer Größe der Follikel. Auch Pardon *et al.* beschrieben bei BNP-Kälbern eine schwere, diffuse lymphatische Depletion in Milz und Lymphknoten,

von der T- und B-Zellareale gleichermaßen betroffen waren (Pardon *et al.* 2010). Dabei waren diese Veränderungen in der Milz in den periarteriellen lymphatischen Scheiden und in den Lymphfollikeln lokalisiert. Bei 18 % der untersuchten Kälber (n = 25) war im Thymus ebenfalls eine lymphatische Depletion nachweisbar (Pardon *et al.* 2010).

1.6 Ätiologie und Pathogenese

Die Ursache der BNP war anfangs unbekannt. Heute herrscht Einigkeit darüber, dass der BNP eine immunologische Ursache zugrunde liegt (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011). BNP wird demnach durch maternale alloreaktive Antikörper (Allo-AK), die das Kalb über das Kolostrum aufnimmt, ausgelöst. Die charakteristischen Knochenmarksbefunde bei BNP-Kälbern galten bereits zu Beginn der wissenschaftlichen Untersuchungen zur Erforschung der Ätiologie von BNP als deutlicher Hinweis auf eine immunologische Ätiologie der Thrombo- und Leukozytopenie (Bauer *et al.* 2009). Diese These wurde durch den Nachweis von gegen Oberflächenantigene von Kälberleukozyten gerichteten Allo-AK im Serum von BNP-Muttertieren bestärkt (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011). Von der BNP betroffene Kälber hatten diese Allo-AK mit dem Kolostrum aufgenommen (Bridger *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011).

1.6.1 Nachweis von Allo-AK bei Bluter-Müttern und BNP-Kälbern

Bisher wurde die Bindung von Allo-AK aus Serum bzw. Kolostrum von BNP-Müttern an Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) und Thrombozyten nachgewiesen (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011, Assad *et al.* 2012). Mittels Durchflusszytometrie konnte eine Bindung von Allo-AK aus Serumproben von BNP-Müttern an Blutleukozyten von gesunden Spenderkälbern demonstriert werden (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011). Dabei besaßen BNP-Muttertiere in allen Studien signifikant höhere Allo-AK-Titer als die Kontrollkühe. Als Kontrollkühe dienten je nach Studie sowohl Kühe aus Herden ohne BNP-Vorgeschichte und ohne Impfungen gegen BVDV, Kühe, die mit einem anderen BVDV-Impfstoff als PregSure® BVD geimpft worden waren und auch PregSure® BVD-geimpfte Nicht-BNP-Mütter. Bei der Betrachtung der verschiedenen Leukozytenpopulationen im Einzelnen wurde deutlich, dass Lymphozyten und Monozyten eine höhere Bindungsaktivität gegenüber IgG-Allo-AK aus den Serumproben der BNP-Muttertiere besaßen als Granulozyten (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Pardon

et al. 2011). Um den zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismus näher zu beleuchten, wurde das Bindungsverhalten kolostraler Allo-AK an unterschiedliche Leukozyten-Populationen aus dem peripheren Blut sowie an Thrombozyten mittels Immunfluoreszenz untersucht. Darüber hinausgehend erfolgte eine immunologische Charakterisierung der Allo-AK (Assad *et al.* 2012). Laut der Autoren handelt es sich bei den BNP-auslösenden Allo-AK ausschließlich um IgG₁-Antikörper. Diese banden an 70 % der Leukozyten und an 100 % der Thrombozyten, unabhängig von der Rassezugehörigkeit der Spenderkälber bzw. Rinder und des Reifestadiums der eingesetzten Zellen. Die Bindung fand dabei sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma statt. Bei den unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen zeigte sich, dass die Allo-AK an alle Granulozyten und Monozyten sowie an fast alle B-Lymphozyten und CD8-positive zytotoxische T-Zellen binden konnten, aber nicht an CD4-positive T-Helferzellen (Assad *et al.* 2012).

Pardon *et al.* untersuchten das Bindungsverhalten der Allo-AK aus Serumproben von BNP-Müttern vergleichend an Blutleukozyten von gesunden Kälbern und von Kälbern, die zuvor eine BNP-Erkrankung überlebt hatten. Dabei reagierten die Leukozyten der ehemaligen BNP-Kälber häufiger mit den Antikörpern aus den Serumproben von BNP-Muttertieren als die Leukozyten der gesunden Kälber (Pardon *et al.* 2011).

Bei BNP-Kälbern offenbarte eine engmaschige Beprobung vor und nach der Kolostrumaufnahme eine deutliche Leukopenie und Thrombozytopenie, die wenige Stunden nach der Kolostrumaufnahme eintraten. Parallel stieg dazu der prozentuale Anteil an IgG-Allo-AK tragenden Leukozyten im Blut deutlich an und erreichte 6 h (3 Kälber) bzw. 12 h (1 Kalb) nach Kolostrumaufnahme den Maximalwert. Die Quote der Allo-AK-positiven Leukozyten variierte dabei zwischen den einzelnen Kälbern von 19 - 100 % und korrespondierte mit dem Schweregrad und Verlauf der BNP (Bridger *et al.* 2011).

Neben den durchflusszytometrischen Nachweisen wurde auch in der direkten Immunfluoreszenz die Bindung der Antikörper aus den Serumproben von BNP-Muttertieren an periphere Leukozyten und darüberhinaus gehend auch an Leukozyten aus dem Knochenmark dargestellt (Pardon *et al.* 2011). Megakaryozyten zeigten in dieser Studie keine Bindung.

Auch in Kolostrumproben von BNP-Müttern konnte das Vorkommen von Allo-AK inzwischen bestätigt werden (Assad *et al.* 2012, Kasonta *et al.* 2014). Gemäß den Immunfluoreszenz-Experimenten von Assad *et al.* handelt es sich bei den kolostralen

Allo-AK ausschließlich um Immunglobuline vom IgG₁-Subtyp, die zu 100 % an Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten banden, aber nicht an bestimmte Lymphozytensubpopulationen (insbesondere CD4⁺ T-Zellen).

In einer anderen Studie wurden alloreaktive Antikörper mit Bindungsaffinität sowohl für bovine Lymphoblasten und sogenannte BK-Zellen (eine bovine Nierenzelllinie, die zur Herstellung des Impfstoffs PregSure® BVD verwendet worden war), als auch für humane Lymphoblasten in Serum- und Kolostrumproben von BNP-Muttertieren nachgewiesen (Kasonta *et al.* 2014).

Eine Forschergruppe will erkannt haben, dass die bovinen, BNP-assoziierten Allo-AK auch an nicht-bovine Zellen wie CHO-K1-Zellen (ATCC®-Nr. CCL-61, Ovarialzellen vom chinesischen Hamster) und equine PBMC binden (Benedictus *et al.* 2015). In einer anderen Studie unter Verwendung von affinitätsaufgereinigten Allo-AK konnte allerdings keine Kreuzreaktivität mit Hamster- und Kaninchen-Nierenzelllinien dargestellt werden (Bastian *et al.* 2011). An körpereigene PBMC binden die BNP-Allo-AK allerdings nicht, die Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen scheint somit intakt (Benedictus *et al.* 2015).

1.6.2 Zusammenhang zw. Kolostrum und BNP

Doll *et al.* und Bauer *et al.* wiesen bereits 2009 darauf hin, dass sich das typische klinische und labordiagnostische Bild der BNP bei betroffenen neugeborenen Kälbern erst nach der Aufnahme von Kolostrum einstellte (Bauer *et al.* 2009, Doll *et al.* 2009). Sie vermuteten deshalb einen kausalen Zusammenhang zwischen der Kolostrumaufnahme und der Entwicklung von BNP. Durch tierexperimentelle Untersuchungen, in denen gesunden, neugeborenen Kälbern aus nicht von BNP betroffenen Rinderherden Kolostrum von BNP-Müttern verabreicht wurde, konnte diese Theorie bestätigt werden (Friedrich *et al.* 2009d, Friedrich *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011, Henniger *et al.* 2014). Bei betroffenen Kälbern sanken innerhalb der ersten zwei Lebenstage sowohl nach natürlicher Kolostrumaufnahme als auch in einem Versuchsaufbau zur Reproduktion der BNP durch Fütterung von Kolostrum von BNP-Muttertieren die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen (Bridger *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011).

1.6.3 Reproduktion von BNP mit Kolostrum, Serum und Immunglobulinpräparaten

In weiteren Untersuchungen zur BNP-Pathogenese wurden sowohl Kolostrum als auch Serum bzw. Immunglobuline probeweise eingesetzt, um das Krankheitsbild von BNP auszulösen. Friedrich *et al.* fütterten 6 Kälber mit Kolostrum von Kühen mit BNP-Vorgeschichte. Drei Kälber erkrankten an BNP (klinische Symptome, hämatologische und Sektionsbefunde) und zwei weitere zeigten typische Blutbildveränderungen (Abfall der Thrombozyten- und Leukozytenwerte nach Kolostrumaufnahme). Die hohe Anzahl an betroffenen Kälbern in dieser Studie stand in Kontrast zu der geringen Inzidenz der BNP im Feld und wurde von den Autoren mit der speziellen Auswahl des Kolostrums von BNP-Muttertieren begründet. Es wurde geschlussfolgert, dass das auslösende Agens im Kolostrum nur weniger Kühe auftritt. Weiterhin wurde deutlich, dass es bei den Kälbern prädisponierende Faktoren zu geben scheint, da in dem Versuch verschiedene Kälber, die das gleiche Kolostrum erhielten, unterschiedlich reagierten (Friedrich *et al.* 2011).

In einer anderen Studie wurde die Rolle des Kolostrums als BNP-auslösendes Agens noch deutlicher (Schröter *et al.* 2011). Hier wurden je nach Zusammensetzung des verabreichten Kolostrums 3 Versuchsgruppen gebildet. In Gruppe 1 erhielten 6 Kälber jeweils das Kolostrum einer anderen Spenderkuh. In Gruppe 2 erhielten 6 Kälber Aliquots desselben Kolostrums einer Kuh. In Gruppe 3 wurden Aliquots eines Mischkolostrums (von 10 Kühen) an 10 Kälber verfüttert. Alle Kolostrum stammten von Kühen, die mindestens ein BNP-Kalb geboren hatten. Die Verwendung von Mischkolostrum führte zur höchsten Letalität. Der Herkunftsbetrieb des Kolostrums und die verabreichte Kolostrummenge spielten für den Verlauf der BNP hingegen keine Rolle. Betriebsspezifische Faktoren in von BNP betroffenen Betrieben scheinen somit keinen signifikanten Beitrag zum Auftreten von BNP zu leisten, allein das Kolostrum erschien ursächlich für die Genese der BNP (Schröter *et al.* 2011).

Die Autoren vermuteten deshalb, dass BNP-Muttertiere polyklonale Antikörper bilden, die im Kalb Thrombozyten, Leukozyten und Megakaryozyten angreifen und zerstören können. Für die Bildung dieser im Kolostrum vorhandenen Allo-AK spielen die Genetik von Mutter und Kalb eine wichtige Rolle, da die Oberflächenantigene auf Blut- und Blutvorläuferzellen durch viele verschiedene Gene kodiert werden. Die Theorie der Autoren besagt, dass eine Kuh Allo-AK gegen als fremd erkannte Antigene produziert. Wenn diese Allo-AK gegen die entsprechenden Oberflächenantigene auf den Blutzellen eines Kalbes gerichtet sind, kommt es zu einer Reaktion beim Kalb. Wenn

eine Kuh hauptsächlich seltene Antigenvarianten besitzt, dann erkennen die von ihr gebildeten Allo-AK viele häufiger vorkommende Antigene. Somit wäre ein Kalb dann besonders gefährdet, an BNP zu erkranken, wenn es vom Vater weit verbreitete Allele für diese Antigene vererbt bekommt. Die Tatsache, dass in diesem Versuchsansatz die Kälber und die jeweiligen Kühe, deren Kolostrum verabreicht wurde, genetisch verschieden waren, hat laut Autoren dazu geführt, dass der Anteil an BNP-Kälbern in dieser Studie höher war, als wenn natürliche Kalb-Mutterpaare verwendet worden wären (Schröter *et al.* 2011).

Auch die Untersuchungen von Henniger *et al.* konnten die Ergebnisse der vorangegangenen Studien stützen. Bei 71 % der 51 Studienkälber wurde durch das Verfüttern von Kolostrum oder Mischkolostrum von BNP-Muttertieren (maximal von 2 Tieren) das klinische Krankheitsbild der BNP ausgelöst. Bei 20 % der Kälber wurde ein subklinischer Verlauf von BNP beobachtet. Auch in dieser Studie wurde die hohe Inzidenz auf die Auswahl des Kolostrums zurückgeführt (Henniger *et al.* 2014).

Nicht nur durch die Verabreichung von Kolostrum, sondern auch durch die Gabe von aufgereinigten Immunglobulinen konnte BNP experimentiell verursacht werden. So gelang es Foucras *et al.* bei 6 neugeborenen Kälbern, die kein Kolostrum erhalten hatten, durch intravenöse Injektion von aufgereinigtem IgG aus den Seren von BNP-Müttern Thrombozytopenie und Leukopenie sowie typische BNP-Symptome wie Petechien, blutigen Kot, und multiple innere Blutungen auszulösen (Foucras *et al.* 2011).

1.6.4 Theorien zur Pathogenese

Der exakte pathogenetische Mechanismus, der bei BNP-Kälbern zur Panzytopenie führt, ist nach wie vor unbekannt (Bastian *et al.* 2011, Bell 2011, Assad *et al.* 2012). Der Hauptvorgang in der Pathogenese der BNP ist vermutlich die Bindung der Allo-AK an hämatopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark sowie an periphere Blutzellen und die daraus resultierende Zerstörung dieser Zellen (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011).

Es besteht noch Forschungsbedarf hinsichtlich der Frage, ob die periphere Zerstörung der Blutzellen oder die Depletion der Stammzellen im Knochenmark die Ursache für die Entwicklung der Erkrankung sind, oder ob beide Schäden zusammenwirken (Foucras *et al.* 2011). In der Literatur werden verschiedene Theorien diskutiert, wie es zum Verlust der Blutzellen und/oder Blutvorläuferzellen im Knochenmark kommt. Schwankungen der Leukozytenzahlen könnten nach der Theorie

von Friedrich *et al.* eine Zerstörung der peripheren Leukozyten und die transendotheliale Migration der Zellen in der Anfangsphase der Erkrankung widerspiegeln, der später die Freisetzung von Zellen aus dem Knochenmark und die finale Depletion aufgrund der Knochenmarksschädigung folgen (Friedrich *et al.* 2011). Auch Bridger *et al.* gehen davon aus, dass es in der Anfangsphase der Erkrankung durch die intravasale Bindung der Allo-AK an Leukozyten und Thrombozyten zu deren Zelltod kommt. Diese Zellzerstörung könne Komplement-vermittelt sein. Die Allo-AK sollen auch gegen Oberflächenantigene der Blutvorläuferzellen im Knochenmark gerichtet sein. In Abhängigkeit von der Menge der zirkulierenden Allo-AK und/oder der (möglicherweise genetisch bedingten) Empfänglichkeit eines Kalbes soll es zur Depletion des Knochenmarks kommen, was zum irreversiblen und letalen Verlauf der Erkrankung führt (Bridger *et al.* 2011).

In den lymphatischen Organen von BNP-Kälbern besteht als Folge der Knochenmarksschädigung ein Mangel an proliferierenden Lymphozyten (Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010) (siehe oben). Diese lymphatische Depletion könne eine Immunsuppression verursachen, und diese wiederum das Auftreten von Infektionen wie Pneumonien und ulzerativen Stomatitiden bei an BNP-erkrankten Kälbern sowie das Fehlen von neutrophilen Granulozyten in einigen von diesen Läsionen erklären (Kappe *et al.* 2010).

Pardon *et al.* äußerten die Vermutung, dass die Thrombozytopenie eher auf der Bindung der Allo-AK an periphere Thrombozyten beruht, als auf der Bindung an die Vorläuferzellen im Knochenmark (Pardon *et al.* 2011). Diese These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in den Versuchen zur Reproduktion der BNP durch Kolostrumgabe die Thrombozytenwerte der Kälber bereits innerhalb von 3 h nach der Kolostrumgabe abfielen (Friedrich *et al.* 2009d, Friedrich *et al.* 2011). Die Autoren argumentierten, dass basierend auf der physiologischen Lebensdauer von Thrombozyten von etwa 5 - 9 Tagen, etwa 10 - 20 % der Thrombozyten pro Tag entfernt und durch „neue“ Zellen aus dem Knochenmark ersetzt werden. Durch einen plötzlich eintretenden, kompletten Wegfall der Thrombozytenfreisetzung aus dem Knochenmark allein ließe sich der bei den Versuchskälbern beobachtete starke Abfall der Thrombozytenwerte nicht erklären. Daher gehen die Autoren von einer peripheren Zerstörung der Blutplättchen als Hauptursache für die Thrombozytopenie aus (Friedrich *et al.* 2011). Die typischen Sektionsbefunde bei BNP-Kälbern zeigen allerdings charakteristischerweise eine Panmyelophthase des Haematopoetischen Gewebes im Knochenmark, von der alle Zellreihen inklusive der Megakaryozyten

betroffen sind (Scholes 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Buck *et al.* 2011). Somit kann man davon ausgehen, dass es im Verlauf der BNP neben der initialen peripheren Zerstörung der Thrombozyten und Leukozyten auch zu einer Schädigung des Knochenmarks kommt, welche dann zur Aufrechterhaltung der Panzytopenie im Blut beiträgt. Das Ausmaß und die Reversibilität bzw. Irreversibilität der Knochenmarksschädigung scheinen entscheidend für den weiteren Verlauf (nicht-letal/letal) der Erkrankung zu sein. Die von einigen Autoren beschriebene Erythro- und Zytophagie durch aktivierte Makrophagen im Knochenmark kann ursächlich zu den hämatologischen Befunden Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie beitragen, da die Blutvorläuferzellen im Knochenmark durch unkontrollierte Phagozytose zerstört werden (Bauer *et al.* 2009, Pardon *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011).

Bastian *et al.* untersuchten aufgrund dieser Hinweise in einem Phagozytose-Assay, ob die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose eine Rolle in der Pathogenese der BNP spielt. Die Bindung von Allo-AK aus Serumproben von BNP-Muttertieren führte in diesen Versuchen zu einer gesteigerten Zytophagozytose von bovinen PHA-stimulierten T-Lymphoblasten durch bovine Makrophagen *in vitro*. Die Autoren interpretierten die Ergebnisse als Beleg für die Opsonierung der Blutzellen durch die Allo-AK (Bastian *et al.* 2011). Sie zogen einen Vergleich mit der humanen alloimmunen Thrombopenie und äußerten die Vermutung, dass in der Pathogenese der BNP aktivierte Phagozyten des Retikulo-Endothelialen-Systems diejenigen Zellen, die durch Allo-AK opsoniert sind, mittels Fc-Rezeptor-vermittelter Phagozytose eliminieren. Pardon *et al.* diskutierten ebenfalls die Theorie, dass aktivierte Makrophagen im Knochenmark durch unkontrollierte Phagozytose von Blutvorläuferzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der BNP spielen (Pardon *et al.* 2010). Dabei erwähnten sie einen Fallbericht, in dem ähnliche Befunde in Blutaussstrichen, nämlich Erythrophagozytose durch Monozyten, bei einer Kuh mit immunvermittelter Thrombopenie und immunvermittelter hämolytischer Anämie festgestellt wurden. Bei dieser Kuh war das Krankheitsbild assoziiert mit der Impfung mit einem multivalenten Botulinum-Toxoid-Impfstoff (Yeruham *et al.* 2003).

Trotz dieser Theorie schließen einige Autoren nicht aus, dass auch weitere immunologische Mechanismen wie die *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC) oder die Komplement-Aktivierung zur Pathogenese der BNP beitragen (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Laming *et al.* 2012). Der Mechanismus der ADCC beruht auf einer spezifischen Bindung von IgG-Antikörpern an die Oberfläche von Zellen. Die freien Fc-Teile der gebundenen Antikörper können von NK-Zellen oder anderen Killerzellen über deren spezifische Fc-Rezeptoren, wie beispielsweise CD16,

gebunden werden. Wenn es dabei zu einer Kreuzvernetzung (*cross-linking*) der Fc-Rezeptoren kommt, werden die Killerzellen zur Ausschüttung zytotoxischer Mediatoren angeregt, was zur Abtötung der antikörpermarkierten Zellen auf extrazellulärem Wege führt (Schütt and Bröker 2011). Dieser Vorgang könnte auch die durch die Allo-AK gebundenen Blut- und Blutvorläuferzellen bei BNP-Kälbern abtöten.

Erste Untersuchungen zu einer möglichen zytotoxischen Wirkung der Allo-AK wurden von Pardon *et al.* (Pardon *et al.* 2010) und in der Dissertation von Schumann (Schumann 2011) durchgeführt. Pardon *et al.* testeten, ob Organmaterialien und Blutzellen von BNP-Kälbern selbst toxische Effekte auf intakte Zellen haben (Pardon *et al.* 2010). Schumann unternahm erste Versuche zum Nachweis einer Komplement-abhängigen Zytotoxizität der Allo-AK aus Serum und Kolostrum von BNP-Muttertieren (Schumann 2011). In beiden Studien konnte kein toxischer Einfluss nachgewiesen werden.

Hinweise auf eine Beteiligung von Komplement-vermittelter Lyse der durch gebundene Allo-AK markierten Zellen an der Pathogenese der BNP geben aktuellere Studien (Kasonta *et al.* 2014, Bell *et al.* 2015, Benedictus *et al.* 2015). In einem durchflusszytometrischen Test zur Bestimmung der Komplementaktivierung *in vitro* führten 10 Allo-AK-haltige Serumproben zu einer Komplement-vermittelten Lyse der als Testzellen verwendeten humanen Lymphoblasten und BK-Zellen (bovine Nierenzelllinie). Allo-AK-negative Kontrollseren übten dagegen keinen zytotoxischen Effekt auf die Testzellen aus. Die Autoren schließen daraus, dass BNP-assoziierte Allo-AK nicht nur an humane Lymphoblasten binden können, sondern für diese Zellen auch zytotoxisch sind. Das Auftreten der Allo-AK in Kolostrum und auch in pasteurisiertem Kolostrumpulver für den Gebrauch als humanes Nahrungsergänzungsmittel könnte demnach ein potentielles Risiko für die Verbraucher solcher Produkte darstellen. Die Autoren halten dieses Risiko aufgrund physiologischer Unterschiede zwischen Rind und Mensch zwar für gering, empfehlen aber sicherheitshalber nur Kolostrum von nicht PregSure® BVD-geimpften Kühen zur Herstellung von Kolostrumprodukten für die menschliche Ernährung zu verwenden (Kasonta *et al.* 2014).

Bell *et al.* konnten mittels Komplement-abhängigen Zytotoxizitätstests (*complement-dependent cytotoxicity assay*, CDC) die zytotoxische Wirkung von BNP-Allo-AK gegenüber bovinen PBMC, Leukozyten und bovinen Knochenmarkszellen *in vitro* darstellen (Bell *et al.* 2015). Unter den Leukozyten wurden dabei hauptsächlich mononukleäre Zellen und kaum Granulozyten abgetötet.

Eine weitere Untersuchung aus dem Jahr 2015 bestätigte durch Experimente an MDBK-Zellen die Fähigkeit der BNP-Allo-AK, Komplement-vermittelte Zelllyse *in vitro* auszulösen. Durch den Vergleich von Wildtyp-MDBK-Zellen mit MDBK-Zellen, bei denen die MHC I-Expression durch Transduktion mit einem viralen TAP-Inhibitor runterreguliert wurde, konnte gezeigt werden, dass die durch die Allo-AK verursachte Zelllyse mit der MHC I-Expression korreliert. So führten BNP-Allo-AK bei den TAP-inhibitierten MDBK-Zellen zu einem signifikant niedrigeren prozentualen Anteil an toten Zellen im Vergleich zu den „normalen“ Wildtyp-MDBK-Zellen (Benedictus *et al.* 2015).

In einer ätiopathogenetischen Studie zur BNP wurde die Funktionalität von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Knochenmarksbiopsien von Kälbern *in vitro* mittels „*clonogenic assay*“ untersucht (Laming *et al.* 2012). Dabei wurden 2 Kälber, die zuvor gepooltes Kolostrum von BNP-Muttertieren erhalten hatten, mit 2 Kontrollkälbern verglichen. Die Untersuchung ergab, dass die Kolonieentwicklung von pluripotenten Vorläuferzellen (CFU-GEMM = *colony forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakaryocyte*) bereits 24 h nach der Gabe des BNP-Kolostrums beeinträchtigt war. Sechs Tage nach der Kolostrumgabe wurden erneut Vorläuferzellen mittels Knochenmarksbiopsie gewonnen. Aus diesen entwickelten sich keine CFU-E-Kolonien (erythroide Vorläuferzellen), und die Entwicklung von pluripotenten Vorläuferzell-Kolonien (CFU-GEMM) und von Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer-Kolonien (CFU-GM) war deutlich reduziert. Aus ihren Ergebnissen schlossen die Autoren, dass die für BNP typischen Befunde im Knochenmark und die klinischen Symptome auf einer Schädigung der pluripotenten Vorläuferzellen innerhalb der ersten 24 Lebensstunden beruhen, welche aber anfangs nicht alle Zelltypen betrifft. Die Hauptzielzelle ist demnach die pluripotente Vorläuferzelle im Knochenmark, wohingegen differenziertere Zellen wie die Erythrozyten- und Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer initial 24 h nach der Kolostrumaufnahme noch keine Beeinträchtigung zeigen (Laming *et al.* 2012). Weiterhin gibt diese Studie Hinweise darauf, dass die in der Anfangsphase der BNP-Erkrankung auftretende Lymphopenie nicht auf einer Subtypen-spezifischen Depletion beruht. Die Autoren zweifeln daran, dass die von anderen Gruppen nachgewiesenen Allo-AK gegen MHC I-Antigene (siehe unten) tatsächlich verantwortlich für die Symptome der BNP sind. Ihrer Meinung nach müssten dann neben den hämatopoetischen Zellen auch andere Zellen betroffen sein, die ebenfalls klassische MHC I-Moleküle exprimieren. Sie vertreten deshalb die Hypothese, dass ein oder mehrere andere gängige Oberflächenantigene, die sowohl auf den Blutvorläuferzellen im Knochenmark als auch auf Lymphozyten vorhanden sind, direkt nach der Kolostrumaufnahme als molekulare Ziele der Allo-AK fungieren. Begründet wird diese

Theorie durch die Beobachtung, dass die Erythrozyten- und Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer initial 24 h nach der Kolostrumaufnahme ebensowenig beeinträchtigt sind, wie periphere Granulozyten im klinischen Verlauf der BNP. Zudem sei die Expression von MHC I zwar auf bovinen Erythrozyten- und Granulozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen (CFU-E und CFU-GM), aber nicht auf pluripotenten Vorläuferzellen (CFU-GEMM) nachgewiesen worden. Mögliche Erklärungen hierfür könnten unterschiedliche Expressionslevel in hoch-aktiven pluripotenten Vorläuferzellen (CFU-GEMM) oder Unterschiede in deren Empfindlichkeit für Schädigungen darstellen. Auch Unterschiede in der Zelltyp-spezifischen Expression von nicht-klassischen MHC I-Molekülen, welche diese Zellen empfindlicher für Schädigungen durch Antikörper mittels *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC) oder Komplement-Aktivierung machen könnten, könnten eine Rolle spielen (Laming *et al.* 2012).

1.6.5 Rolle des Impfstoffs PregSure® BVD

Zwischen dem Auftreten von BNP und dem Einsatz des BVDV-Inaktivatimpfstoffs PregSure® BVD wurde ein epidemiologischer Zusammenhang beschrieben (Kasonta *et al.* 2012, Lambton *et al.* 2012) (siehe auch Punkt 1.2). Mehrere Fall-Kontrollstudien in Europa (Groß-Britannien, Deutschland, Belgien, Frankreich, Niederlande) belegten, dass das Auftreten von BNP mit der Verimpfung von PregSure® BVD assoziiert war. Hierbei zeigte sich, dass die Verwendung des Impfstoffs PregSure® BVD den entscheidenden Risikofaktor (10-fach höheres Risiko bzw. ein mehr als 1.200-fach erhöhtes relatives Risiko) für eine BNP-Erkrankung des Kalbes darstellte (Lambton *et al.* 2012, Sauter-Louis *et al.* 2012, Jones *et al.* 2013). Andere Faktoren des Managements der Kälberhaltung wie z.B. Vitamin E und Selen-Gaben an die Kälber stellten nachweislich kein erhöhtes BNP-Risiko dar (Sauter-Louis *et al.* 2012).

Um zu überprüfen, ob der Impfstoff PregSure® BVD tatsächlich alloreaktive Antikörper induziert, wurden Impfversuche an Meerschweinchen und Kälbern durchgeführt. Im ersten Versuchsansatz wurden Meerschweinchen mit 4 verschiedenen kommerziell erhältlichen BVDV-Impfstoffen geimpft. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der gewonnenen Seren wurde nur in den Serumproben aus PregSure® BVD-geimpften Tieren Antikörper nachgewiesen, die eine Bindung an Oberflächenantigene von bovinen Leukozyten zeigten. In einem zweiten Ansatz wurden 2 Kälber viermalig im Abstand von 3 Wochen mit PregSure® BVD geimpft. In Abhängigkeit von der Anzahl der Booster-Impfungen stieg die Alloreaktivität des Blutserums in der Zielspezies an (Bastian *et al.* 2011).

Die Autoren beschreiben weiterhin eine Affinitätsaufreinigung der Allo-AK, bei der zellgebundene Antikörper von der Oberfläche boviner Leukozyten gelöst wurden. Diese aufgereinigten Allo-AK zeigten dann eine 10-fach gesteigerte Bindungsreaktivität gegenüber bovinen Lymphozyten im Vergleich zu den ursprünglichen Seren. Dieser Effekt wurde nur bei Seren von PregSure® BVD-geimpften Rindern beobachtet, nicht aber bei Seren von Kontrolltieren oder von mit anderen BVDV-Impfstoffen geimpften Rindern. Die aufgereinigten Allo-AK banden *in vitro* besonders stark an Zellen derjenigen bovinen Nierenzelllinie, die für die Herstellung von PregSure® BVD verwendet wurde (Bastian *et al.* 2011). Diese Zelllinie stammt von *Madin-Darby bovine kidney*-Zellen (MDBK-Zellen) ab (Anonym 2016). Die Bindung von Allo-AK aus Serumproben von BNP-Muttern an MDBK-Zellen konnte auch von anderen Autoren nachgewiesen werden (Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011).

In der Studie von Bastian *et al.* (Bastian *et al.* 2011) enthielten Serumproben von Nicht-BNP-Müttern, die ebenfalls mit dem Impfstoff PregSure® BVD geimpft worden waren, eine signifikant schwächere Alloreaktivität als die BNP-Mütter. Hierfür führten die Autoren zu einem Unterschied in der Höhe der Allo-AK-Titer und zum anderen eine Heterogenität in der Spezifität der Allo-AK als mögliche Erklärungen an. Letzteres verdeutlichten sie durch Tests von 7 Serumproben aus BNP-Müttern mit den Lymphozyten aus verschiedenen Spenderkälbern, denn die Allo-AK aus den Serumproben konnten dabei nicht an die Lymphozyten aller Kälber im gleichen Ausmaß binden. Die Allo-AK der einzelnen BNP-Mütter erkannten also vermutlich unterschiedliche Epitope oder Antigene auf den Kälberzellen. Außerdem existierten wohl Unterschiede zwischen den Kälbern hinsichtlich der Expression der Alloantigene.

Mit Serumproben von Kontrollkühen ohne Impfung gegen BVDV und von Kühen, die mit anderen Inaktivimpfstoffen gegen BVDV geimpft worden waren, trat hingegen keine Bindung an Kälberleukozyten auf (Bastian *et al.* 2011). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Untersuchungen von Kasonta *et al.* (Kasonta *et al.* 2014).

In einer vergleichenden Proteom-Analyse wurden der Impfstoff PregSure® BVD, MDBK-Zellen und ein nicht mit BNP-assoziiertes, attenuiertes BVD-Lebendimpfstoff (Vacoviron FS, Fa. Merial) untersucht. Der Proteingehalt in PregSure® BVD betrug mehr als das 3,5-Fache im Vergleich zu Vacoviron FS und stimmte nahezu mit der Menge an Oberflächenprotein überein, die auf MDBK-Zellen gefunden wurde. Zudem konnten 25 Proteine bestimmt werden, die sowohl in PregSure® BVD und in MDBK-Zellen vorhanden waren. PregSure® BVD enthält demnach eine große Menge an Proteinen, die von den zur Impfstoffherstellung genutzten MDBK-Zellen stammen und

wurde folglich bei der Herstellung nicht ausreichend aufgereinigt, um eine Alloimmunisierung zu verhindern (Euler *et al.* 2013). In anderen Untersuchungen wurden allerdings für andere kommerziell erhältliche inaktivierte BVD-Impfstoffe wie beispielsweise Bovilis® BVD/MD und Bovidec® vergleichbare Gesamtprotein-Konzentrationen ermittelt wie in PregSure® BVD (Bastian *et al.* 2011, Deutskens 2012).

1.6.6 Das MHC I-Molekül als potentiell ursächliches Allo-Antigen

Das MHC I-Molekül ist derjenige Stoff, welcher derzeit von den meisten Autoren als mögliches ursächliches Antigen für die Induktion der BNP-assoziierten Allo-AK angesehen wird (Bastian *et al.* 2011, Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Kasonta *et al.* 2012). So bestimmten Deutskens *et al.* mittels Immunopräzipitation zwei Zelloberflächenproteine von bovinen Leukozyten und MDBK-Zellen, an die Allo-AK aus Serumproben von BNP-Müttern binden konnten. In der folgenden massenspektrometrischen Analyse wurden diese Proteine als MHC I und β -2-Mikroglobulin identifiziert (Deutskens *et al.* 2011). Bovine MHC I-Moleküle sind als Kontaminanten nachweislich auch in PregSure® BVD vorhanden (Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Euler *et al.* 2013). Bei der Impfung mit dem Impfstoff PregSure® BVD soll es demnach zu einer Alloimmunisierung des Muttertiers gegen MHC I-Antigene kommen.

Andere Forschergruppen bestätigten experimentiell, dass Antikörper aus BNP-auslösenden Serumproben gegen bovines MHC I gerichtet sind (Foucras *et al.* 2011, Benedictus *et al.* 2014, Benedictus *et al.* 2015). Auch in einer experimentellen Impfstudie mit PregSure® BVD war zumindest der Großteil der induzierten Allo-AK gegen bovine MHC I-Moleküle gerichtet (Kasonta *et al.* 2012).

MHC I-Moleküle sind genetisch bedingt hochgradig polymorph. Bei Rindern kommen mindestens 61 verschiedene für MHC I kodierende Allele vor (Deutskens *et al.* 2011). Dieser Polymorphismus könnte erklären, warum nicht alle mit PregSure® BVD geimpften Kühe Allo-AK bilden und nicht alle Kälber von PregSure® BVD geimpften Müttern an BNP erkranken. Ob eine Kuh auf die Impfung mit der Bildung von Allo-AK reagiert, hängt nach der Theorie von Deutskens *et al.* (Deutskens *et al.* 2011) von ihrer MHC I-Allotyp-Konstellation ab. Wenn diese mit dem MHC I-Allotyp im Impfstoff übereinstimmt, kommt es nicht zu einer Immunreaktion gegen sie. Somit werden auch keine Allo-AK gebildet. Wenn der MHC I-Allotyp im Impfstoff aber von dem einer Kuh abweicht und sie diesen Allotyp deshalb als fremd erkennt, kommt es als Immunreaktion zur Antikörperproduktion gegen diese MHC I-

Moleküle. Diese Antikörper werden über das Kolostrum auf das neugeborene Kalb übertragen, und können dort, abhängig vom MHC I-Allotyp des Kalbes, als Allo-AK BNP auslösen. Es entwickeln aber nur diejenigen Kälber BNP, deren eigener MHC I-Allotyp mit dem der Vakzine übereinstimmt oder diesem zumindest ähnlich ist. Dieser MHC I-Allotyp kann logischerweise nicht von der Mutter stammen, wenn sie diesen als fremd erkannt und Antikörper dagegen gebildet hatte. Vielmehr müssen die Gene für diese MHC I-Varianten in Kälbern paternalen Ursprungs sein (Deutskens *et al.* 2011).

MHC I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen im Körper exprimiert, was die Frage aufwirft, warum bei BNP nur Blutzellen bzw. hämatopoetische Gewebe betroffen sind. Eine mögliche Erklärung liefert die besonders hohe Dichte von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche von hämatopoetischen Zellen (Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011). Eine Untersuchung von Endothel- und Knochenmarkszellen, die aus Kälberfeten im dritten Trimester (7. bis 9. Graviditätsmonat) isoliert worden waren, zeigte zudem, dass Endothelzellen im Vergleich zu peripheren Blutleukozyten eine viel geringere Menge an MHC I-Antigenen auf der Zelloberfläche besitzen und eine geringere Bindung von BNP-Allo-AK aufwiesen. Unter den Knochenmarkszellen konnte man unterschiedliche Populationen differenzieren, die sich durch hohe und niedrige Mengen an MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche sowie die Bindung von mehr oder weniger Allo-AK voneinander unterschieden (Benedictus *et al.* 2015). Auch der unterschiedlichen Empfindlichkeit innerhalb der hämatopoetischen Zellpopulation gegenüber BNP-Allo-AK könnte eine heterogene Expression von bovinem MHC I zugrunde liegen (Foucras *et al.* 2011). Bell *et al.* untersuchten gezielt, ob die bei BNP charakteristische Depletion bestimmter boviner Zellarten von deren MHC I-Expressionslevel abhängt (Bell *et al.* 2015). Mittels indirekter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie belegten sie, dass bovine mononukleäre Leukozyten mehr MHC I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten als Thrombozyten und Granulozyten. Die Menge an MHC I-Molekülen je Monozyt war in dieser Studie ähnlich groß wie bei MDBK-Zellen. *In vitro*-Zytotoxizitätstests ergaben, dass PBMC dann auch signifikant empfindlicher für die zytotoxische Wirkung der Serumproben von BNP-Müttern waren als die bovinen Leukozyten insgesamt. Lichtmikroskopisch ließ sich außerdem bestätigen, dass die genannten Serumproben hauptsächlich mononukleäre Zellen und kaum Granulozyten abtöteten. In analoger Weise waren auch bovine Knochenmarkszellen für den zytotoxischen Effekt von BNP-assoziierten Serumproben umso empfindlicher, je mehr MHC I-Moleküle sie auf der Zelloberfläche exprimierten (Bell *et al.* 2015).

Die Spezifität der BNP-assoziierten Allo-AK für verschiedene bovine MHC I-Haplotypen wurde mit transgenen Varianten der Mäusezelllinie P815 näher untersucht (Bell *et al.* 2015). Nachdem man bei den MDBK-Zellen 5 verschiedene MHC I-Allele identifiziert hatte, wurden diese einzeln auf P815-Zellen transferiert und dort zur Expression gebracht. In einem halb-automatischen Komplement-abhängigen Zytotoxizitätstest (*complement-dependent cytotoxicity assay*, CDC) wiesen Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen generell signifikant höhere Titer an funktional zytotoxischen Allo-AK gegen die transgenen P815-Zellen auf als solche von Kühen, die mit einem anderen BVDV-Impfstoff (Bovilis BVD, MSD Animal Health) geimpft oder nicht gegen BVDV geimpft worden waren. Zwischen BNP-Müttern und anderen PregSure® BVD-geimpften Kühen bestand kein signifikanter Unterschied. Jedoch unterschieden sich die PregSure® BVD-geimpften Kühen voneinander in der Titerhöhe und der Spezifität ihrer Allo-AK für die einzelnen, in den P815-Zellen exprimierten MDBK-MHC I-Haplotypen (Bell *et al.* 2015).

Analoge Versuche wurden im CDC-Test auch mit 12 MHC I-definierten bovinen Leukozytenzelllinien unternommen, die insgesamt 20 verschiedene, definierte MHC I-Allele exprimierten und somit diejenigen MHC I-Haplotypen repräsentierten, die bei mehr als 94 % der Deutsch Holstein-Rinder vorkommen. In diesen Testreihen besaßen PregSure® BVD-geimpfte Kühe ebenfalls signifikant mehr zytotoxische Allo-AK als die Bovilis BVD-geimpften Kühe und die Kontrollkühe. Allerdings wiesen BNP-Mütter hier signifikant höhere Titerwerte auf als die PregSure® BVD-geimpften Nicht-BNP-Mütter. Die Serumproben von BNP-Müttern reagierten dabei durchschnittlich mit 60 % der 12 Zelllinien; während die Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Nicht-BNP-Müttern im Mittel nur mit 39 % der getesteten Zelllinien reagierten. Hier bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichem Allo-AK-Titer und der Anzahl an Zelllinien, mit denen die Serumproben reagierten. Keines der in MDBK-Zellen identifizierten MHC I-Allele war unter den 20 MHC I-Allelen der bovinen Leukozytenzelllinien vertreten. Die Autoren schlossen aus ihren Daten, dass die BNP-assoziierten Allo-AK mit mehreren bovinen MHC I-Haplotypen kreuzreagieren. Folglich bildet eine PregSure® BVD-geimpfte Kuh ein individuelles Gemisch an MHC I-spezifischen Allo-AK, welches solche MHC I-Epitope auf MDBK-Zellen widerspiegelt, die sich von den Epitopen auf ihren eigenen MHC I-Molekülen unterscheiden. Diese Allo-AK reagieren in unterschiedlichem Ausmaß mit MHC I-Allelen anderer Haplotypen kreuz. Diese Reaktivität würde zusammen mit der Anzahl der Epitopspezifitäten, die durch den paternalen MHC I-Haplotyp des Kalbes exprimiert werden, das Risiko für BNP bestimmen (Bell *et al.* 2015).

Benedictus *et al.* stellten die Hypothese auf, dass es von mehreren Faktoren abhänge, warum BNP auch bei Kälbern von PregSure® BVD-geimpften Kühen insgesamt nur so selten auftritt (Benedictus *et al.* 2014). Zum einen spiele die Fähigkeit des Immunsystems der Kuh eine Rolle, Alloantigene aus dem Impfstoff mittels MHC II-Molekülen zu präsentieren. Den zweiten entscheidenden Faktor stelle das Ausmaß dar, in dem der Allotyp der Kuh und die MDBK-Antigene aus dem Impfstoff nicht übereinstimmten sowie die daraus folgende Immunreaktion der Kuh, bzw. das Ausmaß, mit dem der Allotyp des Kalbes und die MDBK-Antigene übereinstimmten. Da es sich bei den postulierten Alloantigenen wie MHC I, β -2-Mikroglobulin und MHC II um genetisch determinierte und damit erbliche Merkmale handelt, untersuchten Benedictus *et al.* die BNP-Erkrankung bei einem Kalb als potentiell erbliches Merkmal des Kalbes oder der Kuh und führten vergleichende Sequenzanalysen der möglichen MHC- und β -2-Mikroglobulin-Kandidatengene durch. Die Analyse offenbarte aber, dass das Auftreten von BNP kein erbliches Merkmal der Kälber darstellte und somit entgegen früherer Vermutungen (siehe oben, Theorie von Deutszens *et al.*) genetische Variationen der paternalen Haplotypen der Kälber für die BNP-Erkrankung nicht relevant sind. Vielmehr scheint ausschließlich der genetische Hintergrund der Kühe entscheidend zu sein. In weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der Allo-AK bestanden auch keine Unterschiede bezüglich der Allo-AK-Isotypen und ihrer Spezifität für Zielzellen zwischen PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern und Nicht-BNP-Müttern. Daraus ließ sich schließen, dass die Allo-AK von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern und PregSure® BVD-geimpften Nicht-BNP-Müttern qualitativ gleich sind und der einzige Unterschied darin besteht, dass die BNP-Mütter höhere Allo-AK-Titer aufweisen. Unterschiede zwischen PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern und Nicht-BNP-Müttern könnten demnach auf solchen Genen beruhen, die die Menge der gebildeten Antikörper nach einer PregSure® BVD-Impfung steuern. Das Auftreten von BNP bei einem Kalb hänge demnach primär von der Menge der aufgenommenen Allo-AK ab (Benedictus *et al.* 2014).

1.6.7 Andere Oberflächenmoleküle als potentiell ursächliche Antigene

Von manchen Autoren wird es durchaus kritisch diskutiert, dass allein die Allo-AK-Reaktivität gegen MHC I die schwere Knochenmarksschädigung bei der BNP auslösen können soll (Kasonta *et al.* 2012). Auch gibt es Theorien, nach denen nicht allein MHC I, sondern auch andere Allo-Antigene als Ursache für BNP bedeutsam sind. So unternahmen Benedictus *et al.* (Benedictus *et al.* 2015) Untersuchungen an einer

Variante der MDBK-Zelllinie, deren MHC I-Expression durch den gentechnischen Knockout des β -2-Mikroglobulin-Gens ausgeschaltet war. Auf diese Weise konnten sie neben MHC I noch zwei weitere Proteine als Ziele der BNP-assoziierten Allo-AK identifizieren, nämlich Integrin- α -3 und Integrin- β -1, die zusammen den „very late antigen-3-rezeptor“ bilden. Der Anteil der Allo-AK in Serumproben, der nicht gegen MHC I gerichtet war, betrug in dieser Studie je nach Probe 9 - 54 %. Allerdings zeigte der Vergleich zwischen dem Grad der MHC I- bzw. Integrin- β -1-Expression und dem Ausmaß der Allo-AK-Bindung bei verschiedenen bovinen Zelltypen (Wildtyp-MDBK-Zellen, β -2-Mikroglobulin-Knockout-MDBK-Zellen, periphere Blutleukozyten und Thrombozyten), dass die MHC I-Expression und die Bindung von Allo-AK bei den peripheren Blutleukozyten und Thrombozyten positiv miteinander korrelierten. Außerdem konnten die Autoren bei dem Versuch, die fraglichen Liganden auf den peripheren Blutleukozyten mittels Immunopräzipitation zu identifizieren, nur MHC I isolieren, nicht aber Integrin- α -3 und Integrin- β -1. Somit scheint MHC I das dominierende Zielantigen der BNP-assoziierten Allo-AK darzustellen (Benedictus *et al.* 2015).

Andere Untersucher hatten zuvor entgegengesetzte Schlüsse gezogen. Euler *et al.* verglichen die Proteinzusammensetzung des Impfstoffs und das Zelloberflächenproteom der MDBK-Zelllinie miteinander und bestätigten die umfangreiche Kontamination des Impfstoffs PregSure® BVD mit MDBK-Proteinen einschließlich MHC I (Euler *et al.* 2013). Allerdings machte MHC I unter den nachgewiesenen Proteinen die kleinste Menge aus. Außerdem beobachteten sie ähnlich wie Assad *et al.*, dass sich das Vorkommen von MHC I-Molekülen (auf allen Lymphozyten) vom Bindungsmuster der BNP-assoziierten Allo-AK (nur bestimmte Lymphozyten-Subpopulationen) unterschied (Assad *et al.* 2012). Diese Befunde werteten die Autoren als Hinweise auf ein entscheidendes anderes, aber noch unbekanntes Allo-Antigen, welches auf allen Zellen myeloiden Ursprungs exprimiert wird, aber nicht auf allen lymphoiden Zellen. Man sah deshalb Analogien zwischen der BNP und der humanen Erkrankung TRALI (Transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz), bei der den gegen MHC I gerichteten Allo-AK im Gegensatz zu den Allo-AK anderer Spezifität (HNA-3a) nur eine untergeordnete Rolle zukommt. Antigene, die sowohl in PregSure® BVD als auch in MDBK-Zellen vorkamen und die das für die BNP entscheidende Allo-Antigen sein könnten, waren z.B. *Vitamin D Binding Protein* (VDBP), *Thrombospondin-1* (TSP-1), *Alpha-1-Acid-Glycoprotein*, *Alpha-1-Antiproteinase* und *Adenylatkinase 2* (AK 2). Diese Proteine hätten wichtige Funktionen im Bereich der Blutgerinnung und ihre gewebliche

Verteilung ähnele der Verteilung der BNP-assoziierten Läsionen und der betroffenen Zellpopulationen (Euler *et al.* 2013).

In einer anderen Studie wurden Transkriptomanalysen an Blutproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf der durch die Boosterimpfung mit PregSure® BVD induzierten Immunantwort (Demasius *et al.* 2013, Euler *et al.* 2013). Die Autoren fanden bei ihren Untersuchungen Hinweise auf eine koordinierte Immunreaktion gegen einen doppelsträngigen RNA-Stimulus. Diese Reaktion war überraschend, da das relevante Impfantigen aus inaktiviertem Einzelstrang-RNA-Virus besteht. Man vermutete, dass der Impfstoff entweder mit doppelsträngiger RNA aus den zur Propagation des Impfvirus verwendeten Zellen kontaminiert war, oder dass eventuell das Adjuvans eine Doppelstrang-RNA-vortäuschende Substanz enthalten hatte, die, wie z.B. *polyinosinic:polycytidylic acid* (*poly I:C*), als Toll-like Rezeptor (TLR)-Agonist fungierte. Allerdings wurden keine Hinweise auf eine klare, koordinierte Immunreaktion gegen ein bestimmtes Allo-Antigen gefunden. Stattdessen wurde ein zuvor unbekanntes Zytokin-ähnliches Gen (Locus XLOC_032517) im bovinen Genom beschrieben, welches nach der PregSure® BVD-Impfung stark hochreguliert wurde. Bislang ist unklar, ob dieses neu beschriebene Gen eine besondere Bedeutung für die Impfung mit PregSure® BVD und in der Pathogenese der BNP besitzt oder in der Immunantwort generell eine Rolle spielt (Demasius *et al.* 2013).

1.6.8 Einfluss des in PregSure® BVD verwendeten Adjuvans und des Impfschemas

Die Höhe eines induzierten Allo-AK-Titers hängt vermutlich nicht nur von der Menge an Allo-Antigen im Impfstoff, sondern auch von dem hochpotenten Adjuvans in PregSure® BVD sowie von der Anzahl der Wiederholungsimpfungen und dem Zeitpunkt der letzten Impfung ab (Bastian *et al.* 2011, Deutsdens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011). Lambton *et al.* konnten in ihrer Fall-Kontrollstudie zeigen, dass das Risiko für ein Kalb an BNP zu erkranken signifikant erhöht war, wenn PregSure® BVD verwendet worden war und nicht ein anderer BVDV-Impfstoff oder wenn gar nicht gegen BVDV geimpft wurde (Lambton *et al.* 2012). Dabei war kein Bezug zur Anzahl der an eine Kuh verabreichten Impfdosen festzustellen, eine höhere Zahl an PregSure® BVD-Impfungen war also bei ihnen nicht mit einem höheren BNP-Risiko für das entsprechende Kalb verbunden. Ebenso hatte der zeitliche Abstand zwischen der letzten Impfung und der Geburt des betrachteten Kalbes in dieser retrospektiven

Analyse keinen signifikanten Effekt auf den BNP-Status des Kalbes (Lambton *et al.* 2012). In einer anderen Untersuchung, die an Kälbern aus einer experimentiellen Ressourcenpopulation (hervorgegangen aus Deutsch Holstein x Charolais-Kreuzungen) des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf vorgenommen wurde, hatten die Parameter Impfzeitpunkt und Impffrequenz bzw. Anzahl der Laktationen der Kühe keinen Einfluss auf die Inzidenz der BNP (Demasius *et al.* 2014). Interessanterweise trat in dieser Studie ein klinischer BNP-Fall noch 679 Tage nach der letzten Booster-Impfung mit PregSure® BVD auf.

Eine andere Veröffentlichung deutet dagegen an, dass das verwendete Impfschema und die Anzahl der Impfungen pro Tier einen Einfluss auf die Allo-Immunisierung durch die Impfung mit PregSure® BVD hat (Kasonta *et al.* 2012). So wurde der Impfstoff in Bayern, einer Region mit hoher BNP-Inzidenz (siehe Punkt 1.1), gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt, wonach die Grundimmunisierung aus 2 Impfungen im Abstand von 3 Wochen besteht und durch Wiederholungsimpfungen nach jeweils 12 Monaten aufgefrischt wird (Anonym 2009c). In Niedersachsen, wo nur wenige BNP-Fälle auftraten (siehe Punkt 1.1), folgte man einem zweistufigen Impfschema, das aus einer ersten Impfung mit einer BVDV-Inaktivatvakzine (z.B. PregSure® BVD) und nachfolgenden Boosterimpfungen mit BVDV-Lebendimpfstoffen wie z.B. Vacoviron FS® (Fa. Merial) bestand (Kasonta *et al.* 2012). Somit hatten Rinder in Niedersachsen, die überhaupt mit PregSure® BVD geimpft worden waren, nur jeweils eine Dosis dieses Impfstoffes erhalten, Tiere in Bayern dagegen im Normalfall mehr als 2 Dosen. In einer experimentellen Impfstudie mit 4 bis 6 Monate alten Bullenkälbern konnte außerdem gezeigt werden, dass die dreimalige Impfung mit PregSure® BVD im Vergleich zum o.g. zweistufigen Verfahren zu einer hoch signifikant stärkeren Induktion von Allo-AK führt (Kasonta *et al.* 2012). In dieser Studie entwickelte in der Impfgruppe des zweistufigen Verfahrens nur ein Bulle einen Allo-AK-Titer, der annähernd so hoch war wie Titer in der reinen PregSure® BVD-Gruppe. Somit scheint klar, dass in den meisten Fällen mehrere Impfdosen von PregSure® BVD nötig sind, um Allo-AK zu induzieren. Diese Schlussfolgerung stützen auch die Resultate einer Fall-Kontroll-Studie, in der das Risiko für ein BNP-Kalb bei PregSure® BVD-geimpften Kühen ab der zweiten Laktation höher war als bei PregSure® BVD-geimpften Erstkalbinnen (Jones *et al.* 2013). Das mit steigender Anzahl an PregSure® BVD-Impfungen wachsende Risiko für ein BNP-Kalb wird auch als Erklärung dafür angesehen, dass BNP erst 3 Jahre nach der Markteinführung von PregSure® BVD aufgetreten ist, wie es in Deutschland, anderen

EU-Staaten und auch in Neuseeland der Fall war (Anonym 2011c, Kasonta *et al.* 2012).

Allerdings scheint für einzelne Tiere bereits eine einmalige PregSure® BVD-Dosis auszureichen, um hinreichend Allo-AK zu bilden. Dies ist jedenfalls abzuleiten aus den wenigen BNP-Fällen in Niedersachsen, die trotz Anwendung des zweistufigen Impfprotokolls aufgetreten sind, sowie aus Beobachtungen im Feld, dass Kühe nach einmaliger PregSure® BVD-Impfung BNP-Kälber zur Welt gebracht haben (Kasonta *et al.* 2012).

Es ist bekannt, dass der Impfstoff PregSure® BVD in Rindern eine starke Immunreaktion gegen die BVDV-Typen 1 und 2 mit sehr hohen Titern an neutralisierenden Antikörpern hervorruft (Salt *et al.* 2004, Harmeyer *et al.* 2005, Raue *et al.* 2011). Diese starke Immunogenität wird unter anderem auf das enthaltene spezielle Adjuvans zurückgeführt (Bastian *et al.* 2011). Bei dem in PregSure® BVD verwendeten Adjuvans handelt es sich um Procision A®, welches Quil A, Cholesterol, Amphigen Base und Drakeol 5 enthält (Anonym 2009c). Quil A ist ein aufgereinigter Extrakt von Quillaja-Saponinen aus dem südamerikanischen Seifenrindenbaum (Sjölander *et al.* 1997, Demana *et al.* 2004, Harms *et al.* 2008). Zusammen mit den anderen Inhaltsstoffen des Adjuvans und dem Antigen bildet Quil A sogenannte *Immuno-stimulating complexes* (ISCOMS) (Lövgren and Morein 1988, Demana *et al.* 2004, Lendemans *et al.* 2005). ISCOMS sind in der Lage, sowohl eine Antigen-spezifische humorale Immunantwort (IgG₁ und IgG₂) als auch T-zellvermittelte Abwehrreaktionen (Th1 und Th2) zu induzieren (Sjölander *et al.* 1997, White *et al.* 2006, Harms *et al.* 2008, Platt *et al.* 2008). Aufgrund dieser potenten immunadjuvanten Wirkung wird es in verschiedenen Impfstoffen für Tiere in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, neben PregSure® BVD z.B. auch in den BVDV-Vakzinen Bovidec® (Fa. Virbac) und Torvac® (Fa. Virbac) für Rinder und in Equip®F gegen Influenza beim Pferd (Demana *et al.* 2004, White *et al.* 2006, Harms *et al.* 2008).

Allerdings haben Quillaja-Saponine wie Quil A als Adjuvantien auch schwerwiegende Nachteile wie unerwünschte zytotoxische und hämolytische Wirkungen und Instabilität in wässriger Phase (White *et al.* 2006, Harms *et al.* 2008, Sun *et al.* 2009). Wegen seiner hohen Toxizität und hämolytischen Aktivität wird Quil A nicht in Humanimpfstoffen verwendet (Demana *et al.* 2004, Harms *et al.* 2008, Sun *et al.* 2009, Vaxjo Aufgerufen am 21.03.2013). Stärker aufgereinigte Extrakte aus Quillaja-Saponinen wie QS 21, QH-A, QH-C und QH-703/ ISCOPREP 703 sind aber Gegenstand von klinischen Studien am Menschen und zeigen durch ihre geringere

Toxizität vielversprechende Ergebnisse (Sjölander *et al.* 1997, Waite *et al.* 2001, Skene and Sutton 2006, Harms *et al.* 2008).

1.6.9 Weitere potentielle Einflussfaktoren auf den Verlauf der BNP

Der Krankheitsverlauf bei BNP-Kälbern scheint sowohl vom MHC I-Allotyp des Kalbes als auch der Spezifität der Allo-AK abhängig zu sein (siehe oben), aber auch von der Titerhöhe im mütterlichen Serum und Kolostrum (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Deutszens *et al.* 2011).

Gleichfalls wichtig für die Krankheitsentwicklung bzw. den Verlauf der BNP ist auch die Menge an aufgenommenem Allo-AK-haltigem Kolostrum bzw. die Menge der über die Darmschleimhaut resorbierten Allo-AK in den ersten 36 Lebensstunden, die von Kalb zu Kalb variiert (Vasseur *et al.* 2009, Deutszens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011).

Die Empfänglichkeit der Kälberleukozyten für die Bindung durch Allo-AK hängt dabei nicht vom Alter der Kälber ab (Bridger *et al.* 2011, Assad *et al.* 2012). Allerdings ist die Aufnahme von kolostralen Antikörpern über die Darmschleimhaut nur innerhalb der ersten Lebenstage möglich (McCoy *et al.* 1970, Stott *et al.* 1979, Clover and Zarkower 1980, Kim and Schmidt 1983, Jaster 2005). Wann genau die sog. Darmschranke für die verschiedenen Immunglobulinklassen jeweils schließt, darüber besteht in der Literatur allerdings Uneinigkeit (Fröhlich 2009). Für IgG werden Werte von 21 - 48 h *p.n.* angegeben, für IgM 16 - 23 h *p.n.* und für IgA 23 - 25 h *p.n.* (Stott *et al.* 1979, Clover and Zarkower 1980, Kim and Schmidt 1983, Fröhlich 2009). Wenn Kälber nicht direkt in den ersten Lebensstunden Kolostrum aufnehmen, kann sich der Eintritt des Darmschrankenschlusses verzögern, und zwar bis zur 33., 31. und 32. h *p.n.* für IgG, IgM bzw. IgA (Stott *et al.* 1979, Stott *et al.* 1979, Fröhlich 2009). Durch diesen physiologischen Vorgang ließe sich erklären, warum an BNP fast ausschließlich Kälber im Alter von wenigen Tagen erkranken.

Als weitere Faktoren, welche möglicherweise die Empfänglichkeit für BNP bzw. den Verlauf der Erkrankung beeinflussen, werden in der Literatur auch vererbliche Merkmale diskutiert (Krappmann *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Ballingall 2011a, Ballingall *et al.* 2011b). Bei Rindern der Rasse Simmentaler kommt eine erbliche hämorrhagische Diathese, bedingt durch eine Dysfunktion der Thrombozyten (Thrombopathie), vor (Steficek *et al.* 1993a, Steficek *et al.* 1993b). Verschiedene Autoren stellten aber fest, dass eine rein hereditäre Genese im Sinne

einer Erbkrankheit als Ursache für BNP unwahrscheinlich ist, da BNP weit verbreitet ist und Kälber unterschiedlicher Rassen und auch Kreuzungskälber betroffen sind (Kappe *et al.* 2010, Bridger *et al.* 2011, Friedrich *et al.* 2011). Abstammungsanalysen, die in Deutschland und den Niederlanden durchgeführt wurden, ergaben auch keine Hinweise darauf, dass sich BNP nur auf bestimmte Zuchtlinien beschränkt (Smolenaars and Mars 2009, Kappe *et al.* 2010). Im gleichen Sinn erschien ein vererbter Gendefekt als Ursache für den BNP-Ausbruch in einer Rinderherde unwahrscheinlich, da die betroffenen Kälber von unterschiedlichen Bullen abstammten (Bell *et al.* 2010b).

Krappmann *et al.* konnten durch ihre Untersuchungen ausschliessen, dass Mutationen im Gerinnungsfaktor XI-Gen mit dem Auftreten von BNP assoziiert sind (Krappmann *et al.* 2010). Allerdings traten in der von ihnen untersuchten Rinderpopulation BNP-Fälle nur bei den Nachkommen eines bestimmten Bullen auf. Dies wurde als Hinweis auf die Beteiligung einer genetischen Komponente in der Pathogenese der BNP angesehen. Untersuchungen an weiteren Nachkommen der gleichen Rinderpopulation bestätigen eine genetische Prädisposition sowohl für klinische als auch subklinische BNP-Fälle bei den Nachkommen des zuvor genannten Bullen (Demasius *et al.* 2014).

Als Kandidaten-Gen wurde auch der polymorphe MHC II-DRB3-Locus auf einen Zusammenhang mit der BNP-Erkrankung untersucht (Ballingall *et al.* 2011b). Der Vergleich der Allel-Frequenzen bei 43 BNP-Kälbern und 68 Kontrollkälbern der Rasse Holstein ergab keinen signifikanten Unterschied. Daraus schlossen die Autoren, dass die Diversität am MHC II-DRB3-Locus nicht im Zusammenhang mit dem Auftreten von BNP bei Holstein-Rindern steht (Ballingall *et al.* 2011b).

Foucras *et al.* betrachten weitere Faktoren, die die Inzidenz und Schwere der BNP-Erkrankung beeinflussen könnten (Foucras *et al.* 2011). Sie weisen darauf hin, dass bei der humanen Erkrankung FNAIT (fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie) eine Korrelation zwischen dem HPA1a-Antikörpertiter der Mutter und dem Schweregrad der Thrombozytopenie bei der Geburt besteht. Im Mausmodell schien die Anwesenheit des neonatalen IgG-Rezeptors FcRn zwingend erforderlich für die Entstehung der FNAIT zu sein. FcRn vermittelte hier den transplazentaren Transport von verschiedenen IgG-Subtypen, auch den der pathogenen FNAIT-verursachenden Antikörper (Chen *et al.* 2010). Genetisch bedingte Variationen im neonatalen IgG-Rezeptor FcRn könnten auch bei BNP die Menge der aufgenommenen Allo-AK beeinflussen. Der neonatale Rezeptor für IgG bei Kälbern ist ein Heterodimer,

bestehend aus dem $\beta 2m$ -Molekül ($\beta 2$ -Mikroglobulin) und einem Homolog der Alpha-Kette des MHC I. Dieser Rezeptor wird von Epithelzellen des Darmes exprimiert und dient bei neonatalen Kälbern der Aufnahme von maternalen IgG-Antikörpern aus dem aufgenommenen Kolostrum und ist damit sehr wichtig für die postnatale Ausbildung einer protektiven Immunität im Kalb. Bestimmte $\beta 2m$ -Haplotypen werden mit dem Krankheitsbild „Versagen des passiven Immunglobulin-Transfers“ bei neonatalen Kälbern in Verbindung gebracht (Clawson *et al.* 2004). Genetische Unterschiede im $\beta 2$ -Mikroglobulin könnten auch eine Rolle bei der Aufnahme der BNP-Allo-AK spielen, da das $\beta 2$ -Mikroglobulin einen Teil des ursächlichen MHC I-Moleküls bildet.

1.6.10 Ausschluss von infektiösen Ursachen, Vergiftungen und Erbkrankheiten

Die infektiösen Ursachen, welche zunächst als Verursacher des Krankheitsbildes der BNP in Betracht gezogen wurden, waren das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV Typ 2), das Virus der *Epizootic Haemorrhagic Disease* (EHDV), das *Bluetongue*-Virus (BTV) und Circoviren.

BVD-Viren gehören zu den Pestiviren und besitzen eine ausgeprägte genetische und antigenetische Heterogenität (Ridpath *et al.* 1994, Vilcek *et al.* 2001, König *et al.* 2006). Bei Infektionen mit bestimmten Stämmen des BVDV kann bei Kälbern eine hämorrhagische Diathese auftreten, die von einem Rückgang der Thrombozyten- und Leukozytenzahlen begleitet ist (Corapi *et al.* 1989, Bolin and Ridpath 1992, Pellerin *et al.* 1994, Stoffregen *et al.* 2000). Dabei handelt es sich um Infektionen mit nicht-zytopathogenen BVD-Viren vom Genotyp 2 (BVDV-2), die eine gesteigerte Virulenz aufweisen und in der Lage sind, das sogenannte „*Hemorrhagic Syndrome*“ auszulösen (Walz *et al.* 1999, Stoffregen *et al.* 2000). In Deutschland treten bisher überwiegend BVDV-1-Stämme auf, während BVDV-2 nur selten vorkommt (Wolfmeyer *et al.* 1997, Cedillo Rosales 2004).

Untersuchungen von an BNP erkrankten und an BNP verstorbenen Kälbern auf Infektionen mit BVDV-1 und BVDV-2 verliefen allerdings negativ (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010). Zudem stammten nahezu alle BNP-Kälber aus Herden, in denen die Muttertiere gegen BVDV geimpft waren (Smolenaars and Mars 2009, Friedrich *et al.* 2009a, Bell *et al.* 2009b, Pardon *et al.* 2009b, Bridger *et al.* 2011). Dabei war bei fast allen Herden nachweislich PregSure® BVD eingesetzt worden (Bell *et al.* 2009a, Pardon *et al.* 2009a, Bridger *et al.* 2011). Diese Vakzine basiert auf einem inaktivierten BVDV-1 des zytopathogenen Stammes 5960 und soll transplazentaren

Infektionen und der Geburt persistent mit BVDV-1 infizierter Kälber vorbeugen (Salt *et al.* 2004, Anonym 2009b, Anonym 2009c). Selbst wenn die anderen in Deutschland zugelassenen Impfstoffe gegen BVD ebenfalls ausschließlich BVDV-1-Antigen enthalten (Salt *et al.* 2004, König *et al.* 2006), erzeugen sie doch zumindest partiell auch Schutz gegen BVDV-2. So induzierte die Grundimmunisierung von Färsen mit PregSure® BVD die Bildung von Antikörpern, die *in vitro* neutralisierende Kreuzreaktivität gegen eine breite Palette von vorwiegend europäischen BVDV-1- und BVDV-2-Stämmen besaßen (Salt *et al.* 2004). Andere Studien belegen experimentiell die zumindest partielle Schutzwirkung der Impfung mit BVDV-1-Impfstoffen gegen akute BVDV-Typ-2-Infektionen (Dean and Leyh 1999, Ellis *et al.* 2001, Makoschey *et al.* 2001, Shimazaki *et al.* 2003, König *et al.* 2006).

Die *Epizootic Haemorrhagic Disease* ist eine weit verbreitete, durch Arthropoden übertragene Erkrankung bei Haus- und Wildwiederkäuern (Albayrak *et al.* 2010, Sarvašová *et al.* 2014). Das verursachende EHDV ist ein doppelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus des Genus *Orbivirus* aus der Familie der *Reoviridae* (Viarouge *et al.* 2015). Das EHDV ist eng mit dem BTV verwandt und beide Viren werden durch stechende Mücken der Gattung *Culicoides* (Gnitzen) übertragen (Schroeder *et al.* 2013, Sarvašová *et al.* 2014). Die durch EHDV und BTV verursachten Erkrankungen gehören in Deutschland zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen (Anonym 2014).

Das Spektrum der Manifestationen einer EHDV-Infektion reicht vom subklinischem Verlauf bis zum akut oder sogar perakut verlaufenden, hämorrhagischen Fieber mit letalem Ausgang (Shope *et al.* 1960, Brodie *et al.* 1998). Ausbrüche der *Epizootic Haemorrhagic Disease* treten überwiegend bei Wildwiederkäuern in Nordamerika, Australien, Asien und Afrika auf, während das EHDV in der EU bisher nicht vorkam (Anonym 2009b, Savini *et al.* 2011, Sarvašová *et al.* 2014). In den letzten Jahren wurden gehäuft Infektionen und klinische Erkrankungen auch bei Rindern beschrieben, zum Teil auch in Staaten, die an die EU angrenzen (Savini *et al.* 2011, Garrett *et al.* 2015). Zudem hat die *European Food Safety Authority* (EFSA) in ihrer Risikoanalyse aus dem Jahr 2009 das Risiko des Eintrags von EHDV nach Europa über Vektoren mit dem Wind als hoch bewertet (Anonym 2009b). Als weitere Eintragungsmöglichkeit für EHDV werden in dem EFSA-Gutachten auch illegale Tiertransporte genannt.

Das dem EHDV verwandte BTV stammt ursprünglich aus Südafrika, und hat sich von dort über den gesamten afrikanischen Kontinent, in Teilen von Asien, in den USA, in Australien und Südeuropa verbreitet und ist heute prinzipiell weltweit verbreitet

(Mehlhorn *et al.* 2008, Anonym 2014). Im Jahr 2006 traten Fälle der Blauzungkrankheit (*Bluetongue Disease*, BT) zum ersten Mal auch in Zentraleuropa (Niederlande, Belgien, Deutschland, Luxemburg und Frankreich) auf (Mehlhorn *et al.* 2008). Im Jahr 2008 wurde in den Niederlanden und Deutschland mit Serotyp 6 ein weiterer zuvor nicht in Europa aufgetretener Serotyp des BTV festgestellt. Bedingt durch die Übertragung über Vektoren (Gnitzen) tritt die Erkrankung saisonal verstärkt in der warmen Jahreszeit bei feuchtwarmen Wetter auf (Anonym 2014). Infektionen mit dem BTV verlaufen bei Wildwiederkäuern meist subklinisch, akute Krankheitsverläufe mit schweren klinischen Symptomen treten vor allem bei Schafen auf, betreffen aber auch Rinder (Mehlhorn *et al.* 2008, Anonym 2014). Die klinischen Erscheinungen der Blauzungkrankheit ähneln den Symptomen der Maul- und Klauenseuche (MKS) und umfassen u. A. Fieber, Ödeme, Entzündungen und hämorrhagische Läsionen und Ulcera der Haut und Schleimhäute (Mehlhorn *et al.* 2008, Anonym 2014). Die namensgebende Blaufärbung der Zunge tritt sehr selten und meistens nur bei hochempfänglichen Schafrassen auf (Anonym 2014). Während des Ausbruchs der Blauzungkrankheit in Zentraleuropa ab 2006 wurden bei Rindern Mortalitätsraten von 1 – 3 % erreicht (Mehlhorn *et al.* 2008). In Deutschland wurde ab Mai 2008 eine flächendeckende Impfung gegen BTV-8 für Rinder, Schafe und Ziegen verpflichtend eingeführt und auch 2009 fortgeführt (Anonym 2012a). Infolgedessen sank die Zahl der Neuausbrüche rasch auf Null ab. Ab 2010 wurde die Impfpflicht aufgehoben und seit Februar 2012 gilt Deutschland als frei von der Blauzungkrankheit (Anonym 2012a).

EHDV und BTV wurden als Ursache der BNP ausgeschlossen, nachdem in mehreren Untersuchungen keine Infektion mit diesen Viren bei an BNP erkrankten und an BNP verstorbenen Kälbern nachgewiesen werden konnte (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010).

Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen BNP und einer durch ein Circovirus verursachten Erkrankung des Geflügels, der Infektiösen Anämie der Küken, wurden auch Infektionen mit Circoviren als potentielle Ursache der BNP betrachtet (Kappe *et al.* 2010). Als charakteristische Symptome treten bei mit dem *Chicken Infectious Anaemia Virus* (CIAV) infizierten Hühnerküken Anämie, Depletionen des Knochenmarks bis zur Aplasie, Blutungen in der Unterhaut und Muskulatur sowie Atrophie des Thymus und der *Bursa fabricii* auf. Die Atrophie des immunologischen Gewebes geht mit Immunschwäche einher (Rosenberger and Cloud 1998, Todd 2000).

Kappe *et al.* wiesen bei 5 von 25 getesteten, an BNP-verstorbenen Kälbern mittels Breitspektrum-PCR Circovirus-DNS nach. In einer PCV2-spezifischen, immu-

histologischen Untersuchung färbten sich einzelne Knochenmarkszellen bei einem von acht BNP-Kälbern schwach positiv an. Allerdings war auch ein Kontrollkalb ohne BNP Circovirus-DNS-positiv (Kappe *et al.* 2010). Diese Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Infektion mit Circoviren und BNP wurden in anderen Untersuchungen jedoch nicht bestätigt (Mueller *et al.* 2009, Kappe *et al.* 2010, Willoughby *et al.* 2010).

An nicht-infektiösen Noxen, die als mögliche Ursache für BNP diskutiert wurden, sind neben den (auto-) immunpathologischen Prozessen toxische Substanzen und Erbkrankheiten relevant. Vergiftungen mit natürlich vorkommenden Toxinen, welche hämorrhagische Diathesen bei Rindern verursachen, sind beispielsweise die akute Adlerfarnvergiftung, die Süßkleevergiftung und die Trichothezentoxikosen (Anonym 1941, Harrach *et al.* 1983, Alonso-Amelot *et al.* 1996, Stöber 2002). Mykotoxine besitzen zudem auch Immunotoxizität (Sharma 1993). Diverse Chemikalien wie z.B. S-[1,2-dichlorovinyl]-L-Cystein (DCVC), welches in mit Trichloräthylen extrahiertem Sojaschrot entstehen kann, oder als Rodentizide verwendete synthetische Kumarinderivate und auch hohe Dosierungen einiger Arzneimittel wie z.B. Furazolidon, Chloramphenicol, nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) und Sulfonamide können zu Schädigungen des Knochenmarks und/oder aplastischen Anämien führen (Schultze *et al.* 1959, Hofmann 1972, Hoffmann-Fezer *et al.* 1974, Hofmann *et al.* 1974, Weiss and Adams 1987, Weiss and Klausner 1990, Nagelkerke and Boogaard 1991, Fox *et al.* 1993, Ammann *et al.* 1996, Lock *et al.* 1996, Friedrich *et al.* 2009a). Es konnte aber keine der verdächtigten Substanzen bei BNP-Kälbern nachgewiesen werden (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010). Auch Untersuchungen von Futterproben auf Mykotoxine und Zytotoxizität ergaben negative Resultate (Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010). Zudem ist die Anwendung von einigen Stoffen heute verboten bzw. nicht mehr gebräuchlich, was sie als Ursache der BNP unwahrscheinlich macht. So sind Furazolidon und Chloramphenicol bei lebensmittelliefernden Tieren EU-weit verboten, und Trichloräthylen wird schon seit längerer Zeit nicht mehr zur Extraktion von Sojaschrot eingesetzt (Stöber 2002, Anonym a, Anonym b).

Eine reine Erbkrankheit als Ursache der BNP wurde von mehreren Autoren als unwahrscheinlich angesehen, da die Erkrankung bei allen in größerem Umfang gehaltenen Rassen und bei Kälbern beiderlei Geschlechts auftritt (Kappe *et al.* 2010, Bell *et al.* 2010b, Bridger *et al.* 2011).

1.7 Therapie und Prophylaxe

Die Letalität der BNP-Erkrankung ist hoch. Verschiedene Therapiemaßnahmen, darunter Bluttransfusionen, diverse antimikrobielle Chemotherapeutika, antiinflammatorische Wirkstoffe, Gerinnungsfaktoren sowie hochdosierte Dexamethasongaben wurden bei BNP-Kälbern versuchsweise eingesetzt (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011). Gesicherte Angaben bezüglich des Erfolgs dieser Maßnahmen fehlen. In vielen Fällen war die Behandlung nicht erfolgreich und die Kälber starben oder mussten eingeschläfert werden (Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010). Pardon *et al.* berichten von einer Überlebensrate von 10 % der von ihnen behandelten klinischen Fälle (Pardon *et al.* 2010). Auch das in einigen Fällen beobachtete Fieber erwies sich als therapieresistent (Friedrich *et al.* 2009a, Friedrich *et al.* 2009b).

Durch Manipulationen wie z.B. das Legen eines Venenkatheters besteht das Risiko für starke Blutungen. Eine vorsorgliche Antibiotikagabe scheint empfehlenswert, da die Kälber immunsupprimiert sind. Dabei sollten Produkte mit langanhaltender Wirkung eingesetzt werden, um die Anzahl der Injektionen zu begrenzen (Bell 2011).

Maßnahmen zur BNP-Prophylaxe betreffen primär das Kolostrummanagement in betroffenen Betrieben. Den Landwirten wird empfohlen, auf die Nutzung eines Kolostrumpools zu verzichten. Vor allem sollte kein Mischkolostrum verfüttert werden, welches Kolostrum von BNP-Muttertieren enthält (Cußler 2011, Kracke 2011, Pahlke 2011). Es sollte außerdem verhindert werden, dass neugeborene Kälber von bekannten BNP-Muttertieren das Kolostrum ihrer Mutter aufnehmen (Bell *et al.* 2010a). Stattdessen muss eine ausreichende Versorgung mit Fremdkolostrum von Kühen ohne BNP-Kälbern oder mit Kolostrumersatzpräparaten sichergestellt werden. Kolostrum von BNP-Muttertieren sollte verworfen werden. Darüberhinausgehend ist die Verwendung von Kolostrum und Blut von Kühen aus von BNP betroffenen Betrieben für kommerzielle Zwecke wie zur Herstellung von Kolostrumersatzpräparaten, von anderen Futterzusatzstoffen oder von Pharmazeutika verboten (Cußler 2011, Kracke 2011, Pahlke 2011). Zudem wird empfohlen, nur Kolostrum von nicht PregSure® BVD-geimpften Kühen zur Herstellung von Kolostrumprodukten für die menschliche Ernährung zu verwenden (Kasonta *et al.* 2014).

2 Alloantikörper

2.1 Definition

Unter Alloantikörpern (Allo-AK) versteht man Antikörper, die gegen ein Alloantigen gerichtet sind. Der Wortteil „Allo“- stammt aus dem Griechischen und bedeutet „anders“. Als Allo-Antigen wird ein löslicher oder immobilisierter, z.B. auf der Zelloberfläche lokalisierter, körpereigener Stoff bezeichnet, welcher nicht bei allen Individuen derselben Spezies vorkommt und deshalb bei Individuen, denen dieses Antigen oder bestimmte Epitope dieses Antigens fehlen, eine Immunantwort auslösen kann.

Der Begriff Allo-Antigen stammt aus der Transplantationsmedizin und beschreibt klassischerweise Polymorphismen der MHC-Moleküle, kann aber auch für genetisch bedingte Strukturunterschiede an anderen Molekülen verwendet werden (Janeway *et al.* 2005). MHC-Antigene gehören zu den Antigenen des *Human Leucocyte Antigen-Systems* (HLA-System) und werden durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) kodiert. Der MHC existiert bei allen Wirbeltieren, welche die Fähigkeit zur akuten Transplantatabstoßung besitzen (Knochenfische, schwanzlose Lurche, Vögel und Säugetiere) und bezeichnet eine auf einem Chromosom lokalisierte Genfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Entscheidung über die Gewebeverträglichkeit, also über die Abstoßung oder Akzeptanz eines Transplantats spielt. Die Genprodukte des MHC werden deshalb auch Transplantations-, Gewebeverträglichkeits-, Histokompatibilitäts-, Leukozyten- oder Lymphozytenantigene genannt. Es existieren drei verschiedene MHC-Klassen: Die Genprodukte der MHC-Klassen I und II sind Glykoproteine, die auf der Zellmembran exprimiert werden. Klasse III-Gene dagegen kodieren Komplementfaktoren. MHC I-Antigene sind auf der Oberfläche aller kernhaltiger Zellen nachweisbar und kommen in haploider Expression auch auf Spermien vor. Retikulozyten und reife Erythrozyten tragen MHC I-Antigene in Form der Bg-(Bennett-Goodspeed) Antigene. MHC II-Antigene kommen nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen vor (Wiesner and Ribbeck 2000, Eckstein 2001b, Schütt and Bröker 2011).

Zwei Individuen einer Spezies, die unterschiedliche MHC-Allele aufweisen, werden als allogene bezeichnet. Allogene Transplantationen sind Transplantationen von Geweben zwischen Individuen, die nicht verwandt sind und die sich somit in ihren

MHC-Allelen unterscheiden. Das Transplantat wird Allotransplantat genannt. Bei allo-genen Transplantationen kommt es zur Transplantatabstoßung durch T-Zell-vermittelte Immunreaktionen, wenn der Empfänger nicht immunsupprimiert ist. Eine Immunreaktion von T-Zellen, die durch körperfremde MHC-Moleküle ausgelöst wird, bezeichnet man als alloreaktive Immunantwort. Bei Bluttransfusionen spielen MHC-Antigene keine Rolle, weil Erythrozyten und Thrombozyten nur in sehr geringem Maß MHC I-Protein exprimieren und MHC II auf diesen Zellen nicht vorkommt (Janeway *et al.* 2005).

2.2 Entstehung und Vorkommen

Die Bildung von Antikörpern als Folge der Exposition eines Individuums zu den spezifischen Antigenen eines anderen Individuums derselben Spezies wird als Alloimmunisierung bezeichnet (Baiochi and Nardoza 2009). Sie tritt in der Humanmedizin beispielsweise bei inkompatiblen Bluttransfusionen und Organtransplantationen auf. Die Alloimmunisierung kommt auch in Schwangerschaften vor, bei denen der Fetus Blutzellantigene paternalen Ursprungs exprimiert, die der Mutter fehlen.

Bei der Abstoßung von allogenen Transplantaten spielen auch Allo-AK eine Rolle. Zwar kommt der zellvermittelten Immunität hier die größte Bedeutung zu, aber auch Allo-AK können beteiligt sein und eine hyperakute, akute oder chronische Antikörper-vermittelte Abstoßung (*hyperacute, acute and chronic antibody-mediated rejection*, AMR) auslösen (Janeway *et al.* 2005, Roddy *et al.* 2005, Clatworthy *et al.* 2010, Paantjens *et al.* 2011). Diese Allo-AK können bereits vor der Transplantation vorhanden sein, wenn zuvor eine Sensibilisierung auf MHC-Antigene, z.B. durch eine vorausgegangene Transplantation, eine Bluttransfusion oder eine Schwangerschaft stattgefunden hat (Janeway *et al.* 2005, Clatworthy *et al.* 2010). Bei einer Transplantation kann es aber auch *de novo* zur Induktion der Allo-AK kommen. Neben MHC-spezifischen Antikörpern scheinen auch Allo-AK anderer Spezifität negativen Einfluss auf den Erfolg von Transplantationen haben zu können. Wichtige Allo-Antigene scheinen dabei vor allem MHC I-verwandte/ähnliche Antigene wie *major histocompatibility complex class I-related chain A* (MICA) und MICB, aber auch Vimentin und Angiotensin II-Rezeptoren vom Typ I zu sein (Clatworthy *et al.* 2010).

Im Rahmen von Bluttransfusionen spielen vor allem Blutgruppenantigene der Erythrozyten eine bedeutende Rolle. Unter Blutgruppen im engeren Sinn versteht man genetisch determinierte erbliche Eigenschaften der Erythrozyten, die Antigencharakter haben. Die Blutgruppenantigene eines Individuums können in einem anderen

Individuum immunogen wirken und die Bildung spezifischer Antikörper induzieren. Blutgruppenfaktoren, deren Bildung vom gleichen Chromosomenlocus gesteuert wird, werden in einem Blutgruppensystem zusammengefasst. Eine Blutgruppe ist durch die Existenz spezifischer, gegen sie gerichteter Antikörper definiert (Janeway *et al.* 2005). Die zugrundeliegenden Blutgruppengene sind sog. „schwache“ Histokompatibilitätssysteme (Eckstein 2001b).

Beim Menschen und den Haussäugetieren gibt es zahlreiche Blutgruppensysteme. So sind beim Menschen bislang 36 verschiedene Blutgruppensysteme beschrieben worden (Anonym 2017). Beim Rind wurden 104 verschiedene Blutgruppen nachgewiesen, bei Schaf und Ziege mehr als 20 (Wiesner and Ribbeck 2000). Beim Menschen sind hauptsächlich das AB0-System, das Rhesussystem und das Kellsystem bei Bluttransfusionen zu beachten. Im AB0-System kommen bei fast allen Menschen blutgruppenkonträr natürliche Antikörper vor, die sogenannten Isoagglutinine Anti-A und Anti-B. Diese werden als reguläre Antikörper bezeichnet, im Gegensatz zu den „irregulären“ Antikörpern in anderen Blutgruppensystemen. Zur Vermeidung von Transfusionszwischenfällen muss daher im AB0-System streng blutgruppenkompatibel transfundiert werden, um die Gefahr eines hämolytischen Transfusionszwischenfalls, ausgelöst durch die Antigen-Antikörperreaktion an der Oberfläche der übertragenen Erythrozyten, zu vermeiden (Wiesner and Ribbeck 2000). Das Rhesus- und das Kellsystem erfordern wegen der starken Antigenität der Merkmale ebenfalls antigenkompatible Transfusionen.

2.2.1 Alloantikörper beim Menschen

Bei Schwangerschaften, bei denen eine fetomaternale Inkompatibilität bezüglich Blutzellantigenen besteht, kann es zur Alloimmunisierung der Mutter gegen ihr fremde fetale Antigene, die der Fetus vom Vater geerbt hat, kommen. Menschen besitzen eine *Placenta haemomonochorialis*, bei der der fetale und der maternale Blutkreislauf nur durch das Chorionepithel voneinander getrennt sind. Deshalb ist ein Übertritt von Zellen sowohl vom Fetus zum maternalen Kreislauf als auch umgekehrt möglich. Dieser bilaterale Zelltransfer wurde für Erythrozyten und auch für kernhaltige Zellen wie z.B. Lymphozyten beschrieben (Walknowska *et al.* 1969, Herzenberg *et al.* 1979, Bianchi *et al.* 1990, Simpson and Elias 1993, Lo *et al.* 1996). Zellen fetalen Ursprungs konnten bereits in frühen Schwangerschaftsstadien (6. - 18. Woche) im maternalen Blut nachgewiesen werden (Herzenberg *et al.* 1979, Bianchi *et al.* 1990, Lo *et al.* 1990,

Simpson and Elias 1993), der früheste Nachweis gelang bereits 33 Tage *post conceptionem* (Thomas *et al.* 1994).

Das Auftreten von gegen Leukozyten gerichteten Antikörpern im Serum von schwangeren Frauen wurde bereits in den 1950er Jahren entdeckt (Van Rood *et al.* 1958, Payne 1962, Dufty and Outteridge 1985). Solche gegen leukozytäre Antigene (HLAs) gerichteten Antikörper wurden bei Männern oder Frauen ohne Schwangerschaften nicht nachgewiesen, bei gebärenden Frauen aber umso häufiger je mehr Schwangerschaften sie durchlaufen hatten (Payne 1962, Terasaki *et al.* 1970, Burke and Johansen 1974). In serologischen Studien zeigte sich die Leukozytenagglutinierende bzw. lymphozytotoxische Wirkung dieser Antikörper gegenüber den Blutzellen des dazugehörigen Vaters und des/der Nachkommen (Payne 1962, Burke and Johansen 1974). Diese maternalen Antikörper waren offensichtlich gegen die Histokompatibilitätsantigene der fetalen Leukozyten (HLA) gerichtet, welche genetisch vom Vater stammten (Burke and Johansen 1974, Regan *et al.* 1991).

Neben ganzen Zellen ist bei Frauen auch ein Übertritt von maternalen IgG-Immunglobulinen über die Plazenta in den Fetus möglich. Auf diesem Weg können auch Allo-AK gegen fetale Blutzellantigene in den fetalen Kreislauf gelangen und verschiedene Erkrankungen des Fetus oder Neugeborenen verursachen (Eckstein 2001a, Eckstein 2001c, Maheshwari *et al.* 2002, Kaplan 2006, Gramatges *et al.* 2009). Wichtige Beispiele für Allo-AK-vermittelte Erkrankungen des Menschen sind der *Morbus haemolyticus neonatorum* (Englisch: *hemolytic disease of the fetus and newborn*, HDFN, siehe Nr. 2.3.1.) und die Fetale/Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FAIT/NAIT, siehe Nr. 2.3.2). Bestimmte maternale Allo-AK gegen fetale, vom Vater vererbte granulozytäre Alloantigene der neutrophilen Granulozyten sind die Ursache der selteneren Neonatalen Alloimmunneutropenie (ANN, siehe Nr. 2.3.3) (Maheshwari *et al.* 2002, Gramatges *et al.* 2009)

2.2.2 Alloantikörper beim Rind

Auch bei Wiederkäuern (Schafen, Ziegen und Rindern) wurden lymphozytotoxische Allo-AK nachgewiesen, obwohl diese Tierarten eine *Placenta epitheliochorialis* besitzen, die im Gegensatz zur *Placenta haemomonochorialis* des Menschen den diaplazentaren Übertritt von Antigenen und Immunglobulinen kaum zulässt (Ford and Elves 1974, van Dam *et al.* 1976, Caldwell *et al.* 1977, Newman and Hines 1979, Newman and Hines 1980, Dufty and Outteridge 1985). Bei Färsen sind vor der Geburt nur sehr selten niedrige Titer von lymphozytotoxischen Allo-AK vorhanden

(Newman and Hines 1979, Newman and Hines 1980, Dufty and Outteridge 1985). *Post partum* war der Anteil Allo-AK-positiver Tiere deutlich größer (35 % bzw. 42 % der untersuchten Erstkalbinnen) (Newman and Hines 1980, Dufty and Outteridge 1985). Im 3. Monat nach der Kalbung erreichte der Anteil der Kühe mit lymphozytotoxischen Allo-AK den Höchstwert. Auch die Titerwerte stiegen im gleichen Zeitraum an. Deshalb gehen die Autoren davon aus, dass der Stimulus für die Produktion von Allo-AK hauptsächlich zum Zeitpunkt der Geburt oder während der Frühphase der Uterusinvolution auftritt. Bei allen Allo-AK-positiven Rindern wurden 2 Wochen *post partum* IgG-Allo-AK gefunden, bei ca. 73 % waren zu diesem Zeitpunkt auch noch Allo-AK der Klasse IgM vorhanden (Newman and Hines 1980). Die Persistenz der Allo-AK-Titer variierte zwischen einem und mehreren Monaten *post partum* (Newman and Hines 1979).

Unter weiblichen Rindern, die bereits mehrfach gekalbt haben, ist der Anteil der Tiere mit lymphozytotoxischen Allo-AK mit etwa zwei Drittel höher als bei Färsen (Newman and Hines 1979, Dufty and Outteridge 1985). Diese Antikörper treten im Vergleich zu Erstkalbinnen zu früheren Zeitpunkten in der Trächtigkeit auf, erreichen höhere Titerwerte, besitzen eine breitere Spezifität und persistieren länger (Newman and Hines 1979, Newman and Hines 1980).

Im Vergleich zum Menschen, wo bereits vor der 20. Schwangerschaftswoche lymphozytotoxische Allo-AK nachgewiesen wurden (Burke and Johansen 1974), treten diese beim Rind erst viel später auf. Der früheste Nachweis bei Färsen gelang 10 Tage vor der Geburt, allerdings bestanden vor der Geburt generell nur sehr niedrige Titer (Newman and Hines 1980). Dies könnte ebenfalls durch die epitheliochoriale Plazenta des Rindes bedingt sein, die durch ihren mehrschichtigen Aufbau eine stärkere Trennung zwischen fetalen und maternalen Kreislauf gewährleistet und dadurch eine bessere Barrierefunktion auch für zelluläre Antigene darstellt, als die hämochoriale Plazenta des Menschen. Erst kurz vor oder unter der Geburt kommt das maternale Immunsystem offenbar mit ausreichenden Mengen an fetalem Antigen in Kontakt, um darauf mit der Bildung von Antikörpern zu reagieren (Newman and Hines 1979, Newman and Hines 1980).

Deshalb kommt bei Rindern das Phänomen der transplazentaren Alloimmunisierung gegen erythrozytäre Antigene, welches beim Menschen als HDFN (siehe Nr. 2.3.1) schon sehr lange bekannt ist, praktisch nicht vor (Stormont 1975, Newman and Hines 1980). Alle Fälle in denen Allo-AK-bedingte Erkrankungen bei Rindern beschrieben wurden, gingen auf eine iatrogene, exogene Alloimmunisierung von

Kühen zurück, nachdem Vakzinen gegen Babesiose oder Anaplasmosen bei Muttertieren eingesetzt worden waren, die bovine Erythrozyten enthielten. Die Kühe bildeten dabei Allo-AK gegen solche erythrozytäre Blutgruppenantigene in der Vakzine, die bei ihnen selbst nicht vorhanden waren (Dennis *et al.* 1970, Dimmock and Bell 1970, Langford *et al.* 1971, Stormont 1975, Osterhoff and de Vos 1977, Dowsett *et al.* 1978).

2.3 Alloantikörper-vermittelte Erkrankungen beim Menschen

2.3.1 *Morbus haemolyticus neonatorum (hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN)*

Morbus haemolyticus neonatorum (hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN) bezeichnet eine schwere Antikörper-induzierte hämolytische Anämie des Feten bzw. Neugeborenen beim Menschen. Voraussetzung für das Auftreten dieser Störung ist ein vom Vater ererbtes Blutgruppenantigen des Fetus, welches der Mutter fehlt und wogegen sie Antikörper besitzt oder bildet (Eckstein 2001a). Maternale IgG-Allo-AK können die Plazenta passieren und verursachen eine Hämolyse fetaler bzw. neonataler Erythrozyten (Eckstein 2001a, Eder 2006, Basu *et al.* 2011).

Die Erkrankung kann bereits intrauterin auftreten und zu Komplikationen bis hin zum Fruchttod führen (*hemolytic disease of the fetus, HDF*). Oder sie äußert sich postnatal als Anämie und ausgeprägter Ikterus (*hemolytic disease of the newborn, HDN*) (Eckstein 2001a, Eder 2006). Der Schweregrad der Krankheitserscheinungen ist vom Ausmaß der Hämolyse abhängig und korreliert mit der Wirksamkeit und Menge der übergetretenen Allo-AK, dem bzw. den unter den Allo-AK vorherrschenden IgG-Subtyp(en) und der Anzahl der antigenen Bindungsstellen auf den Erythrozyten (Pollock and Bowman 1990, Eckstein 2001a, Basu *et al.* 2011). Schwere Erkrankungsformen werden vor allem durch Allo-AK vom IgG₁-Subtyp oder einer Kombination aus IgG₁ und IgG₃-Antikörpern verursacht (Pollock and Bowman 1990).

Gemäß der verursachenden Antigen-Inkompatibilitäten wird die HDFN in drei Gruppen eingeteilt: Die klassische Rhesusinkompatibilität (Anti-D, Rh D-hemolytic disease), die AB0-Inkompatibilität (AB0-hemolytic disease) und andere Blutgruppeninkompatibilitäten (*hemolytic disease due to alloantibodies other than D*) (Eckstein 2001a, Basu *et al.* 2011). Dabei ist die Epidemiologie der HDFN in

verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen unterschiedlich und spiegelt die Häufigkeitsverteilung der Blutgruppenallele in den verschiedenen Populationen direkt wieder (Eder 2006). In der westlichen Welt ist heute die AB0-Inkompatibilität die wichtigste und häufigste Ursache für HDFN. In vielen Entwicklungsländern inklusive Indien kommt die klassische Rhesusinkompatibilität nach wie vor häufig vor. Und auch in den USA treten etwa noch 6,7 Fälle pro 1.000 Lebendgeburten auf (Eder 2006, Basu *et al.* 2011). Als mögliche Ursachen hierfür kommen unzureichende Geburtsvorsorge oder ein Versagen bei der Verabreichung der Rh-IG-Immunprophylaxe sowie eine pränatale Sensibilisierung vor der Rh-IG-Gabe in der 28. Schwangerschaftswoche in Frage (Eder 2006).

Die klassische Rhesusinkompatibilität (Anti-D, *Rh D-hemolytic disease*)

Die klassische Rhesusinkompatibilität tritt auf, wenn eine D-(Rhesus-) negative Mutter ein D-(Rhesus-) positives Kind trägt (Eckstein 2001a). Es wurden auch seltene Fälle von anti-D-Alloimmunisierung bei schwangeren Dw-positiven Frauen beschrieben (Eder 2006, Basu *et al.* 2011). Diese gehören dem Phänotyp mit einer schwachen Expression der D-Antigene an (weak D, Dw). Eine Alloimmunisierung gegen D-Antigene ist dabei nur bei bestimmten Dw-Frauen möglich, welche abweichende, anomale D-Proteine exprimieren (Eder 2006).

Die klassische Rhesusinkompatibilität äußert sich klinisch meistens als schwere Form der HDFN, die oft ein therapeutisches Eingreifen bereits pränatal in Form von intrauteriner Bluttransfusion erfordert (Eckstein 2001a, Eder 2006). Rh D gilt als das potenteste Allo-Immunogen unter den erythrozytären Antigenen. Eine Menge von nur 0,1 - 1 ml an D-positiven Erythrozyten kann die Alloimmunisierung verursachen (Basu *et al.* 2011). Dabei hat die IgG-Subklasse der gebildeten anti-Rh (D)-Allo-AK einen entscheidenden Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung. Pollock *et al.* berichten, dass die schwersten klinischen Fälle mit dem Auftreten von IgG₁-Allo-AK assoziiert waren. Wenn gleichzeitig auch noch IgG₃-Allo-AK beteiligt waren, beobachteten sie noch schwerere Verlaufsformen. Dagegen verursachten IgG₃-Allo-AK alleine keine schweren Formen der HDFN (Pollock and Bowman 1990).

Die AB0-Inkompatibilität (*AB0-hemolytic disease*)

Die AB0-Inkompatibilität tritt fast ausschließlich bei Müttern mit der Blutgruppe 0 auf, die mit A1- oder B-Kindern schwanger sind (Eckstein 2001a, Basu *et al.* 2011). Dabei kommt die 0/A1-Inkompatibilität häufiger vor als die 0/B-Unverträglichkeit. Andere Konstellationen, bei denen die Mutter nicht dem Typ 0 entspricht, führen selten

zu Unverträglichkeiten (Eckstein 2001a, Basu *et al.* 2011). Die AB0-Inkompatibilität kann auch bei Rh (D)-negativen Frauen auftreten (Basu *et al.* 2011).

Klinisch zeigt die HDFN, der eine AB0-Inkompatibilität zugrunde liegt, in der Regel einen milden, gutartigen Verlauf und ist spontan reversibel. Dieser benigne Verlauf soll auf die nur schwache Expression der A- und B-Antigene auf den Erythrozyten von Feten und Neugeborenen zurückzuführen sein (Eckstein 2001a, Basu *et al.* 2011).

Als Voraussetzung für die klinische Manifestation der AB0-assozierten HDFN müssen alloimmune Isoagglutinine der Klasse IgG in der Mutter vorhanden sein, weil konventionelle Anti-A- und Anti-B-Immunglobuline zur Klasse IgM gehören und IgM-Antikörper nicht in der Lage sind, die Plazenta zu passieren (Eckstein 2001a). Die Bildung dieser immunen Isoagglutinine kann auch exogen durch das Eindringen von ähnlichen Fremdanitgenen aus der Umwelt in den maternalen Körper induziert sein. Aus diesem Grund kann die AB0-Inkompatibilität bereits in der 1. Schwangerschaft auftreten (Eckstein 2001a).

Andere Blutgruppeninkompatibilitäten

Theoretisch betrachtet kann jedes fetale Blutgruppenantigen, das für den maternalen Organismus fremd ist, bei entsprechendem Kontakt zur Alloimmunisierung mit Bildung von IgG-Allo-AK führen (Eckstein 2001a, Eder 2006). In der Praxis kommt dies bei bestimmten Antigenen häufiger vor. Dabei sind hauptsächlich gegen Rh-Antigene, v.a. gegen c und E, sowie gegen Kell-Antigene, v.a. gegen K, gerichtete Allo-AK als Ursache für klinisch bedeutende Hämolysen beschrieben worden (Filbey *et al.* 1995, Eckstein 2001a, Eder 2006, Koelewijn *et al.* 2008).

2.3.2 Fetale/Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FAIT/NAIT)

Die Fetale/Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FAIT/NAIT) ist das Thrombozyten-Äquivalent der HDFN und äußert sich klinisch meistens als schwere, isoliert auftretende Thrombozytopenie bei ansonsten gesunden Neugeborenen (Kaplan 2006, Roberts *et al.* 2008). Ursache für dieses Krankheitsbild ist die Alloimmunisierung der Mutter gegen vom Vater geerbte thrombozytäre Antigene des Feten, die der Mutter fehlen (Eckstein 2001c, Kaplan 2006, Roberts *et al.* 2008). Thrombozyten exprimieren HLA-Klasse I-Antigene und AB0-Blutgruppenantigene auf ihrer Oberfläche. Diese spielen aber kaum eine Rolle in der Pathogenese der FAIT/NAIT, da die Erkrankung hauptsächlich durch Allo-AK gegen Thrombozyten-spezifische Antigene (*Human*

Platelet Antigen, HPA) hervorgerufen wird (Kaplan 2006). Ca. 95 % der Fälle in kaukasischen Bevölkerungsgruppen werden durch feto-maternale Inkompatibilitäten bezüglich 3 der 16 bekannten HPAs verursacht, nämlich die Antigene HPA-1a, HPA-5b und HPA-15b (Roberts *et al.* 2008). HPA-1a kommt als FAIT/NAIT-verursachendes Allo-Antigen am häufigsten vor (ca. 90 % der Fälle), gefolgt von HPA-5b mit einer viel niedrigeren Frequenz (ca. 5–15 %) (Ahya *et al.* 2001, Kaplan 2006). Daneben kann gelegentlich auch HPA-3a eine Rolle spielen (Ahya *et al.* 2001, Roberts *et al.* 2008). Bei Asiaten tritt die FAIT/NAIT dagegen in Verbindung mit dem HPA-4-System auf (Kaplan 2006).

Im Gegensatz zur HDFN kann die FAIT/NAIT bereits in der ersten Schwangerschaft auftreten (Eckstein 2001c, Kaplan 2006, Roberts *et al.* 2008). Die Erkrankung kann sich intrauterin (FAIT) oder postpartal (NAIT) manifestieren. Da maternale IgG-Allo-AK die humane Plazenta ab der 14. Schwangerschaftswoche passieren können, und die fetalen Thrombozyten-Allo-Antigene bereits in der 18. Woche vollständig exprimiert werden (Kaplan *et al.* 1985, Gruel *et al.* 1986), kann die fetale Thrombozytopenie bereits früh in der Schwangerschaft auftreten (Kaplan 2006, Roberts *et al.* 2008). Nach der transplazentaren Passage binden die Allo-AK an die fetalen Thrombozyten. Anschließend werden die mit Allo-AK beladenen Thrombozyten vom retikuloendothelialen System des Fetus aus dem fetalen Blutkreislauf entfernt (Ahya *et al.* 2001, Berkowitz *et al.* 2006). Da aber der Schweregrad der FAIT/NAIT kaum mit dem maternalen Allo-AK-Titer korreliert, scheinen neben dieser immunvermittelten Thrombozyten-Depletion weitere Mechanismen zur Pathogenese und dem Schweregrad der Erkrankung beizutragen (Warwick *et al.* 1994). In der Studie von Warwick *et al.* wurde das Wachstum von fetalen und neonatalen Thrombozyten-Vorläuferzellen (*colony forming unit-megakaryocytes*, CFU-MK), welche HPA-1a-Antigene besaßen, durch HPA-1a-Allo-AK-haltige Seren aus FAIT/NAIT-Schwangerschaften *in vitro* gehemmt (Warwick *et al.* 1994). Dabei korrelierte der Grad der Hemmung mit dem Schweregrad der FAIT/NAIT-Fälle. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch eine reduzierte Thrombozytenproduktion durch Hemmung der Megakaryozyten eine Rolle in der Pathogenese der FAIT/NAIT spielt (Warwick *et al.* 1994, Berkowitz *et al.* 2006). Die Schwere der Erkrankung kann sowohl vom Ausmaß der Thrombozytenzerstörung als auch von der Kapazität der Megakaryozyten, die Thrombozytenzerstörung zu kompensieren, abhängen (Ahya *et al.* 2001). Der entscheidende Mechanismus der Thrombozytenzerstörung beinhaltet hochgradig-affine Fc-Gamma-Rezeptoren (FcγR) auf den Effektorzellen (Ghevaert *et al.* 2008). Thrombozyten, die mit anti-HPA-1a-IgG markiert

sind, interagierten mit Monozyten über FcγR der Typen I und II (Turner and Hadley 2003). Durch den Einsatz eines modifizierten, rekombinanten HPA-1a-Antikörpers (B2G1Δnab), der selbst keine destruktive Wirkung auf die Thrombozyten ausübte, gelang es Ghevaert *et al.* die Bindung von natürlichen HPA-1a-Allo-AK aus Seren von betroffenen Müttern an HPA-1a positive Thrombozyten *in vitro* zu inhibieren (Ghevaert *et al.* 2008). Offensichtlich wurde die Bindung der zerstörenden Antikörper verhindert, da ihre Bindungsstellen an den Thrombozyten bereits durch den modifizierten Antikörper blockiert waren. Die mittels Chemolumineszenz gemessene, reaktive Antwort der Monozyten auf Thrombozyten, die den modifizierten Antikörper gebunden hatten, war gegenüber der Reaktion auf anti-HPA-1a-Allo-AK-markierte Thrombozyten deutlich reduziert. Durch Einsatz des modifizierten Antikörpers in einem Mausmodell konnte die FcγR-vermittelte Thrombozytenzerstörung durch anti-HPA-1a-Antikörper *in vivo* verhindert werden. Die Autoren schließen daraus, dass ein solcher blockierender Antikörper möglicherweise in der pränatalen Therapie der FAIT von großem Nutzen sein kann (Ghevaert *et al.* 2008).

In einer anderen Studie konnte der Pathomechanismus der durch anti-HPA-1a-Allo-AK vermittelten Thrombozytenzerstörung in einem Phagozytose-Assay *in vitro* dargestellt werden (Wiener *et al.* 2003). In diesem Test vermittelten 4 von 6 getesteten anti-HPA-1a-Seren die Phagozytose von HPA-1a-positiven Thrombozyten durch humane Monozyten. Dieser Prozess war von der Konzentration des Serums, welches für die Sensibilisierung der Thrombozyten eingesetzt worden war, abhängig und konnte durch Cytochalasin D fast vollständig gehemmt werden. HPA-1a-negative Thrombozyten wurden in diesem Test nicht von den Monozyten phagozytiert. Weiterhin wurde getestet, ob verschiedene Fc-Gamma-Rezeptor reaktive Substanzen in der Lage sind, die von anti-HPA-1a-Allo-AK induzierte Phagozytose der Thrombozyten zu hemmen und somit möglicherweise in der Therapie der FAIT/NAIT von Nutzen zu sein. Hier zeigte sich, dass der humanisierte monoklonale anti-FcγR I-Antikörper H22 die Phagozytose komplett hemmen konnte, ebenso wie vergleichbare Konzentrationen an Immunglobulinen (IVIG). Die intravenöse Applikation von Immunglobulinen (IVIG) an die Mutter wird standardmäßig in der Therapie der FAIT/NAIT eingesetzt. Monomere IgGs, anti-FcγR II-Antikörper und anti-FcγR III-Antikörper zeigten *in vitro* nur eine sehr geringe bzw. keine inhibierende Wirkung. Aus diesen Ergebnissen schließen die Autoren, dass von den drei humanen Fcγ-Rezeptor-Klassen der FcγR I die Hauptrolle in der von anti-HPA-1a-Allo-AK induzierten Phagozytose der Thrombozyten durch Monozyten spielt, wohingegen der FcγR II nur von untergeordneter Bedeutung ist. Der

anti-FcγR I-Antikörper H22 könnte als Alternative zu den IVIG in der Therapie der FAIT/NAIT eingesetzt werden (Wiener *et al.* 2003).

Die Inzidenz der FAIT/NAIT wird mit einem Fall pro 800 - 1.000 Lebendgeburten bzw. pro 1.000 - 1.500 Schwangerschaften angegeben (Kaplan 2006, Roberts *et al.* 2008).

Das klinische Bild der FAIT/NAIT variiert von einer subklinischen, moderaten Thrombozytopenie bis hin zu lebensbedrohlichen Blutungen (Roberts *et al.* 2008). Bei 10 - 20 % der betroffenen Kinder führen intrakranielle Blutungen zum Tod oder verursachen dauerhafte neurologische Schäden (Eckstein 2001c, Berkowitz *et al.* 2006, Kaplan 2006). Diese intrakraniellen Blutungen können bereits intrauterin in der 30. - 35. Schwangerschaftswoche auftreten, in seltenen Fällen schon vor der 20. Woche (Ahya *et al.* 2001). Bei nachfolgenden Schwangerschaften ist Gefahr für FAIT/NAIT sehr hoch, und die Schwere der Erkrankung nimmt zu (Berkowitz *et al.* 2006, Kaplan 2006).

Diagnostisch ist der Nachweis zirkulierender, maternaler Allo-AK und die Identifikation des thrombozytären Zielantigens mit Bestimmung des Thrombozyten-Phäno- und -Genotyps beider Eltern nötig (Kaplan 2006). Bei einem bekannten Risiko (Anamnese bei vorherigen Schwangerschaften, nachgewiesene Alloimmunisierung der Mutter), bei unklaren Testergebnissen oder bei unbekannter Vaterschaft kann heute auch eine pränatale Bestimmung des fetalen Genotyps an Amnionzellen, Blutzellen oder Chorionzotten diagnostisch hilfreich sein (Ahya *et al.* 2001, Eckstein 2001c, Berkowitz *et al.* 2006, Kaplan 2006).

2.3.3 Neonatale Alloimmunneutropenie (ANN) bzw. Fetale/ Neonatale Alloimmungranulozytopenie

Die Neonatale Alloimmunneutropenie (ANN) (Synonym: Fetale/Neonatale Alloimmungranulozytopenie) ist die Folge einer Alloimmunisierung der Mutter gegen fetale, vom Vater vererbte granulozytäre Allo-Antigene der neutrophilen Granulozyten (HNAs). Die Erkrankung tritt auf, wenn solche maternalen IgG-Antikörper gegen granulozytäre Antigene die Plazenta passieren (Eckstein 2001c, Maheshwari *et al.* 2002, Curtis *et al.* 2005, Marin *et al.* 2005, Gramatges *et al.* 2009). Die Allo-AK opsonieren die fetalen bzw. neonatalen neutrophilen Granulozyten, die daraufhin von Milzmakrophagen zerstört werden. Der Schweregrad der verursachten Neutropenie ist dabei abhängig vom Antikörpertiter und der IgG-Subklasse (Maheshwari *et al.* 2002).

Von den 7 in der Literatur beschriebenen für Neutrophile spezifischen Antigenen (Human Neutrophil Antigen, HNA) scheinen HNA-1a, HNA-1b und HNA-2a am häufigsten an der Entstehung der ANN beteiligt zu sein (Bux *et al.* 1992, Zupanska *et al.* 2001, Curtis *et al.* 2005, Marin *et al.* 2005).

Daneben wurden aber auch viele andere Antigene als ursächlich verdächtigt, darunter auch HLA (Maheshwari *et al.* 2002, Gramatges *et al.* 2009). Ob Allo-AK gegen HLA tatsächlich eine Ursache für ANN darstellen, ist jedoch unklar (Tomicic *et al.* 2003). Ein kausaler Zusammenhang zwischen Anti-HLA-Antikörpern und ANN wurde bisher nur sehr selten angenommen, was wohl auch daran liegt, dass die leukozytären HLA bei Neonaten nur schwach exprimiert werden (Puri *et al.* 1993, Hagimoto *et al.* 2001, Tomicic *et al.* 2003, Marin *et al.* 2005, Gramatges *et al.* 2009).

Die Häufigkeitsangaben für das Auftreten der ANN variieren stark von 0,1 - 20 % (Bux *et al.* 1992, Zupanska *et al.* 2001, Maheshwari *et al.* 2002).

In einer Studie, in der bei 1.038 Schwangerschaften nur die Antigene HNA-1a und HNA-1b betrachtet wurden, bestand in 19,6 % der Fälle eine feto-maternale Inkompatibilität. Bei 4,5 % der Frauen wurden Granulozyten-spezifische Allo-AK nachgewiesen, allerdings war keines der Kinder neutropenisch. Die Autoren schlussfolgerten, dass ANN im Zusammenhang mit diesen beiden Antigenen bei weniger als 0,1 % der Schwangerschaften auftritt (Zupanska *et al.* 2001). Diese niedrige Frequenz der klinischen Manifestation könnte laut Zupanska *et al.* neben anderen Faktoren auch mit einer niedrigen Expression der Antigene auf den neonatalen neutrophilen Granulozyten zusammenhängen (Zupanska *et al.* 2001).

Verdacht auf das Vorliegen der ANN besteht immer dann, wenn bei einem Neugeborenen, dessen Mutter gesund ist, eine isolierte Granulozytopenie bei normaler oder gesteigerter Myelopoese festgestellt wird (Eckstein 2001c). Die Diagnose erfordert den Nachweis der gegen neutrophile Granulozyten gerichteten Allo-AK (Gramatges *et al.* 2009).

Der Verlauf der Erkrankung ist häufig mild. Da die Spiegel der transplazentar erworbenen maternalen Antikörper innerhalb von einigen Wochen bis wenigen Monaten nach der Geburt absinken, ist das Krankheitsgeschehen der ANN in den meisten Fällen selbstlimitierend (Maheshwari *et al.* 2002). Wegen der Neutropenie kann es aber vermehrt zu bakteriellen Infektionen kommen (Eckstein 2001c, Maheshwari *et al.* 2002). Insgesamt versterben bis zu 5 % der an ANN erkrankten Neonaten (Maheshwari *et al.* 2002, Curtis *et al.* 2005).

2.4 Alloantikörper-vermittelte Erkrankungen beim Tier

2.4.1 Immunthrombozytopenie bei neugeborenen Ferkeln und Fohlen

Die neonatale Alloimmunthrombozytopenie bei Schweinen und Pferden beruht auf einer fetomaternalen Thrombozyteninkompatibilität, wodurch Muttertiere gegen plättchenspezifische Alloantigene des Fetus immunisiert werden (Schmidt *et al.* 1977, Amrhein and Bostedt 2003, Forster 2007). Voraussetzung für die Bildung von Allo-AK durch das Muttertier ist, dass diese paternale Antigene auf den fetalen Thrombozyten als fremd erkennt, wenn fetale Blutplättchen in den späten Phasen der Trächtigkeit oder unter der Geburt in den maternalen Kreislauf gelangen, beispielsweise wegen einer Läsion an fetalen Blutgefäßen (Schmidt *et al.* 1977, Amrhein and Bostedt 2003). Gelangen die maternalen Allo-AK bei der späteren Kolostrumaufnahme dann in den neonatalen Kreislauf, kommt es zu einer starken Depletion an Thrombozyten, welche sich klinisch als hämorrhagische Diathese äußert (Amrhein and Bostedt 2003, Forster 2007).

Das Krankheitsbild der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie kommt hauptsächlich bei Saugferkeln vor, in Einzelfällen erkranken aber auch neugeborene Fohlen der Pferde und möglicherweise Maultier-Fohlen (Schmidt *et al.* 1977, Traub-Dargatz *et al.* 1995, Buechner-Maxwell *et al.* 1997, Amrhein and Bostedt 2003, Forster 2007). Bei Schweinen und Equiden treten wegen der Plazentastruktur (*Placenta epitheliochorialis*) bei diesen Spezies intrauterin keine maternalen Antikörper in den Fetus über. Somit werden auch Allo-AK erst innerhalb der ersten 48 Stunden *post natum* mit dem Kolostrum aufgenommen. Aus diesem Grund entwickelt sich die Alloimmunthrombozytopenie der Schweine und Equiden auch erst *post natum* zwischen dem ersten und dritten Lebenstag (Schmidt *et al.* 1977, Amrhein and Bostedt 2003). Der Schweregrad der Erkrankung hängt von der Menge der aufgenommenen Allo-AK ab. Wenn dieselben Elterntiere erneut angepaart werden, kann während der folgenden Graviditäten der Titer dieser maternalen Allo-AK weiter ansteigen (Amrhein and Bostedt 2003). Das ist auch der Grund, warum die Erkrankung bei Ferkeln zumeist erst ab dem zweiten Wurf ausbricht (Amrhein and Bostedt 2003). Meistens sind beim Schwein zuerst die größten, gut entwickelten Ferkel eines Wurfs betroffen (Stormorken *et al.* 1963, Saunders and Kinch 1968, Amrhein and Bostedt 2003). Eine Erklärung hierfür könnte das stärker zunehmende Blutvolumen bei schnell wachsenden Ferkeln bieten (Saunders and Kinch 1968). Mit steigendem Blutvolumen wächst auch der

Bedarf an Thrombozyten, um die Blutwerte innerhalb der physiologischen Grenzwerte zu halten. Bei vermindertem Nachschub aus dem Knochenmark reicht die Zahl der neugebildeten Thrombozyten vermutlich bei den am schnellsten wachsenden Ferkeln hierfür nicht mehr aus. Die Autoren vermuten, dass bei der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen zerstört werden und die Blutbildungsaktivität des Knochenmarks vermindert wird. Zusätzlich könnte auch eine periphere Zerstörung von Thrombozyten auftreten (Saunders and Kinch 1968). Denkbar ist aber auch, dass die größten Ferkel am meisten Kolostrum und damit auch eine größere Menge an Allo-AK aufnehmen und aus diesem Grund schwerer betroffen sind als kleinere Ferkel.

Nach der oralen Aufnahme von Allo-AK kommt es zunächst zur Bindung dieser Antikörper an die Thrombozyten. Als Folge werden diese mit Allo-AK dekorierten Blutplättchen schnell durch das retikuloendotheliale System abgebaut oder durch Komplement-vermittelte Lyse zerstört (Schmidt *et al.* 1977, Amrhein and Bostedt 2003). Schwere Verlaufsformen der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie enden oft innerhalb weniger Tage tödlich, mildere Verläufe kommen selten vor. In der Literatur sind Morbiditätsraten von bis zu 70 % und Mortalitätsraten von bis zu 100 % angegeben (Amrhein and Bostedt 2003).

2.4.2 Neonatale Isoerythrolyse der Equiden

Die neonatale Isoerythrolyse (NI) ist eine mit hämolytischer Anämie einhergehende Erkrankung des neugeborenen Fohlens, die durch maternale Allo-AK gegen paternale Blutgruppenfaktoren verursacht wird (Arnold 2006). Die NI ist die häufigste Ursache für hämolytische Anämien und Ikterus bei neugeborenen Fohlen (Polkes *et al.* 2008). Das Krankheitsbild der NI tritt bei Pferden und Maultieren auf und war schon im 18. Jahrhundert bekannt (Stormont 1975, Snook 2001, Boyle *et al.* 2005). Ursache für die Zerstörung der Erythrozyten sind maternale Allo-AK gegen erythrozytäre Blutgruppenantigene, die das Fohlen vom Vater geerbt hat. Auch bei dieser Erkrankung nimmt das Fohlen die Allo-AK erst nach der Geburt mit dem Kolostrum auf (Snook 2001). Die Mutter, welcher das entsprechende Allel fehlt, wird durch Kontakt mit diesem Blutgruppenfaktor sensibilisiert und zur Bildung von Allo-AK angeregt. Da dieser Kontakt meistens erst spät in der Trächtigkeit oder sogar erst bei der Geburt stattfindet, ist es unwahrscheinlich, dass schon das zu diesem Zeitpunkt der Exposition getragene bzw. geborene Fohlen von der NI betroffen ist. Gefährdet sind vielmehr Fohlen aus folgenden Trächtigkeiten (Snook 2001) .

Beim Pferd existieren 8 Hauptblutgruppensysteme, die als A, C, D, K, P, Q, T und U benannt sind. Die zugrundeliegenden Faktoren werden jeweils mit dem Buchstaben des Systems und einem Kleinbuchstaben für den betreffenden Faktor bezeichnet (Snook 2001). Für ca. 90 % der NI sind Allo-AK gegen die Blutgruppenfaktoren Aa und Qa verantwortlich. Man nimmt deshalb an, dass diese Faktoren die stärksten alloimmunisierenden Eigenschaften haben. Da die gegen Aa und Qa gerichteten Allo-AK hämolytisch wirken, wird außerdem vermutet, dass agglutinierende Allo-AK für die Pathogenese der NI weniger bedeutend sind (Snook 2001, de Graaf-Roelfsema *et al.* 2007). In seltenen Fällen sind andere Blutgruppenfaktoren als Allo-Antigen für die NI ursächlich. Auch unspezifische hämolytische Allo-AK wurden als Ursache der NI beschrieben (de Graaf-Roelfsema *et al.* 2007).

Nach der Aufnahme der Allo-AK über das Kolostrum verursachen diese die Zerstörung der Erythrozyten des Fohlens. Mechanistisch sind dabei vor allem die extravaskuläre Hämolyse und die Beseitigung von Antikörper-beladenen Erythrozyten durch das retikuloendotheliale System von Bedeutung. Daneben tritt auch intravasale Hämolyse auf (Snook 2001). Etwa 14 % aller Fohlen haben bezüglich ihrer Erythrozyten-Antigene Inkompatibilitäten mit der Mutterstute. Die Prävalenz von NI liegt aber weit niedriger, da es nicht bei jeder Inkompatibilität zu einer Alloimmunisierung der Stute während der Trächtigkeit kommt (Polkes *et al.* 2008).

Die Prävalenz von NI variiert außerdem zwischen den verschiedenen Pferderassen. Sie hängt von den Wahrscheinlichkeiten ab, dass die Stute Allo-AK produziert und dass das Fohlen einen inkompatiblen und alloimmunisierenden Blutgruppenfaktor vom Hengst geerbt hat, sowie von der Menge an Allo-AK im Kolostrum, der Antigenität des verursachenden Blutgruppenfaktors und der Menge der vom Fohlen absorbierten Allo-Immunglobuline (de Graaf-Roelfsema *et al.* 2007). Angegeben werden in der Literatur Prävalenzen von 1 % bei Vollblutpferden (*Thoroughbreds*) und 2 % bei Trabrennpferden (*Standardbreds*) (Snook 2001, de Graaf-Roelfsema *et al.* 2007, Polkes *et al.* 2008).

Die NI kommt auch bei Maultieren vor, hier ist der sogenannte „*Donkey-Factor*“ das ursächliche Allo-Antigen. Da dieses Antigen allen Pferdestuten fehlt, bergen alle Anpaarungen zwischen Pferdestuten und Eselhengsten das Risiko für NI. Für das Auftreten der Erkrankung bei Maultierfohlen wird eine Prävalenz von 10 % geschätzt (Snook 2001).

Das klinische Bild der NI ist von der Anämie geprägt. Der Schweregrad der klinischen Symptome hängt vom Schweregrad der Anämie ab. Allo-AK gegen Aa

verursachen sehr schwere Fälle von NI mit perakutem Verlauf, wohingegen Allo-AK gegen Qa meist mildere Krankheitsverläufe auslösen (Snook 2001). Die Fohlen sind bei der Geburt normalerweise unauffällig und erkranken, erst innerhalb von 5 Stunden bis zu 5 Tagen, in einigen Fällen sogar erst bis zu 12 Tagen, nach der Aufnahme des Kolostrums (Snook 2001, Boyle *et al.* 2005). Anzeichen der NI sind Schwäche, Lethargie, blasse Schleimhäute, Ikterus, Hämoglobinurie, Tachykardie, Tachypnoe, Fieber und Kreislaufstörungen bis hin zum Schock (Snook 2001). Als Komplikationen können Kernikterus, Leberversagen und Sepsis auftreten. Diese stellen die häufigsten Todesursachen bei Fohlen mit NI dar. Beim Kernikterus, der auch als Bilirubin-enzephalopathie bezeichnet wird, kommt es durch die Anhäufung von unkonjugiertem Bilirubin in Gehirnzellen zu neurologischen Störungen (Polkes *et al.* 2008). Hämatologisch auffällig sind der verringerte Hämatokrit (PCV < 25 %) und die verminderte Erythrozytenzahl. Der Anteil an freiem Hämoglobin kann erhöht sein, der Gesamtbilirubinwert und das unkonjugierte Bilirubin sind als Folge der Hämolyse stets erhöht. Bei schwerem Verlauf kann sich wegen der ausgeprägten Gewebshypoxie und Azotämie durch toxische Schädigung der Nieren eine metabolische Azidose manifestieren (Snook 2001). Therapeutisch werden bei schweren Fällen Bluttransfusionen durchgeführt, die weitere Therapie richtet sich nach den klinischen Symptomen (Snook 2001, Boyle *et al.* 2005).

2.4.3 Neonatale Isoerythrolyse der Rinder

Die NI ist auch als eine Erkrankung von Kälbern bekannt. Sie tritt aber nicht oder nur extrem selten natürlicherweise als Folge einer transplazentaren Alloimmunisierung gegenüber erythrozytären Antigenen auf (Stormont 1975, Newman and Hines 1980). Alle beschriebenen Fälle von neonataler Isoerythrolyse bei Kälbern stehen vielmehr mit einer iatrogenen Alloimmunisierung in Zusammenhang, wobei Vakzinen gegen Babesiose oder Anaplasmosen bei den Muttertieren eingesetzt wurden, die bovine Erythrozyten enthielten. Die betroffenen Kälber waren bei der Geburt unauffällig und entwickelten erst nach der Aufnahme von Kolostrum eine akute hämolytische Anämie (Dennis *et al.* 1970, Dimmock and Bell 1970). Die Kühe bildeten Allo-AK gegen solche erythrozytäre Butgruppenantigene in der Vakzine, die bei ihnen selbst nicht vorhanden waren. Kälber, die diese Antigene vom Vater geerbt hatten, erkrankten nach der Aufnahme des Allo-AK-haltigen Kolostrums. Durch Bindung der Allo-AK an die Erythrozyten kam es intravasal zu deren Lyse, was zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führte. Die daraus entstehende Verbrauchskoagulopathie wurde als

die Hauptursache für akute Todesfälle angesehen, welche die Ausbrüche an immunhämolytischer Anämie bei Kälbern begleiteten (Dowsett *et al.* 1978). Der Schweregrad und der Verlauf der impfassoziieren, Allo-AK-vermittelte Erkrankung hing vor allem davon ab, wieviele Allo-AK die neugeborenen Kälber aufgenommen hatten und variierte von perakut mit Tod innerhalb von 24 h *post natum* über eine akute schwere Anämie mit Ikterus und Todesfolge innerhalb von 5 Tagen *post natum* bis zur nichtletalen, vorübergehenden moderaten Anämie (Dennis *et al.* 1970). Die Allo-AK-Dosis hing vom Allo-AK-Titer im Serum und im Kolostrum der Kuh zum Zeitpunkt der Geburt ab. Der Titer war wiederum von der Anzahl und Frequenz der Impfungen, dem Zeitraum zwischen der letzten Impfung und dem Abkalben, dem Grad der Blutgruppeninkompatibilität zwischen Kuh und Vakzine und dem individuellen Vermögen der Kuh, Antikörper zu bilden, beeinflusst (Dowsett *et al.* 1978). Beim Rind wurden rasseabhängige Unterschiede in der Häufigkeit der NI bisher nur vermutet (Osterhoff and de Vos 1977).

III Material und Methoden

1 Probengewinnung

1.1 Betriebsdaten

Für diese Arbeit wurden Serumproben, die in den Jahren 2008 - 2011 von weiblichen Rindern aus 6 verschiedenen Betrieben gesammelt worden waren, untersucht. In den Betrieben waren unterschiedliche BVDV-Impfstoffe eingesetzt worden. **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die beprobten Betriebe. Die Blutproben waren jeweils von TierärztInnen der Klinik für Wiederkäuer bzw. des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen, entnommen, zu Serumproben weiterverarbeitet und als solche archiviert worden.

PregSure® BVD-Impfbetriebe

Die beiden Betriebe A und B hatten den BVDV-Impfstoff PregSure® BVD (Fa. Pfizer) regelmäßig gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Impfschema eingesetzt. Die Grundimmunisierung erfolgte durch 2 Impfungen im Abstand von 3 Wochen, die Wiederholungsimpfungen danach im Abstand von ca. 12 Monaten. In diesen Betrieben wurden 166 Serumproben von gegen BVDV-geimpften Kühen und Färsen gewonnen (je Rind eine Probe) (**Tabelle 1**). In beiden Herden waren zuvor mehrere BNP-Fälle bei Kälbern aufgetreten. Die Betriebe befanden sich in Nordrhein-Westfalen und in Hessen.

Aus dem PregSure® BVD-Impfbetrieb A standen Serumproben von 118 Kühen im Alter von ≥ 2 Jahren zur Verfügung. In dieser Herde hatten 24 Muttertiere ein oder mehrere BNP-Kälber zur Welt gebracht. Im PregSure® BVD-Impfbetrieb B konnten 48 Rinder, davon 39 im Alter von ≥ 2 Jahre, beprobt werden. Die übrigen 9 Tiere waren jünger, aber ebenfalls bereits mit PregSure® BVD geimpft worden. In diesem Betrieb gab es nur 3 BNP-Muttertiere.

Andere BVDV-Impfbetriebe

Zusätzlich wurden Serumproben von je 50 weiblichen Rindern aus einem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb (Betrieb C) sowie einem Bovidex®-Impfbetrieb (Betrieb

D) in der vorliegenden Studie untersucht (**Tabelle 1**). In beiden Betrieben wurden nur Tiere im Alter von > 2 Jahren beprobt. In diesen Herden waren keine Kälber mit BNP aufgefallen. Die Betriebe befanden sich in Hessen und in Oberbayern.

Kontrollbetriebe

Als Kontrollen dienten die Serumproben von jeweils 25 weiblichen Rindern im Alter von ≥ 2 Jahren in zwei Betrieben E und F, in denen nicht gegen BVDV geimpft wurde und in denen keine BNP-Fälle aufgetreten waren (**Tabelle 1**). Beide Herden galten im Sinne der BVDV-Verordnung als BVD-unverdächtig. Die Betriebe befanden sich in Hessen und in Rheinland-Pfalz.

Tabelle 1: Übersicht über die beprobten Betriebe

Betrieb	Rasse	Impf-status	Verwendete BVD-Vakzine	Anzahl im Betrieb		
				Kühe & Färsen	beprobte Kühe & Färsen	BNP-Mütter
A	Deutsche Holstein	BVDV, BTV	PregSure® BVD (Fa. Pfizer)	150	118	24
B	Deutsche Holstein	BVDV, BTV	PregSure® BVD (Fa. Pfizer)	52	48	3
C	Charolais	BVDV, BTV	Bovilis® BVD-MD (Fa. Intervet)	300	50	0
D	Fleckvieh	BVDV, BTV	Bovidec® (Fa. Virbac)	60	50	0
E	Diverse	BTV	-	70	25	0
F	Deutsche Holstein	BTV	-	80	25	0

Erläuterungen: BVDV: Bovine-Virusdiarrhoe-Virus
BTV : *Bluetongue*-Virus

1.2 Spenderkälber

Für die Untersuchungen auf Allo-AK wurden die Blutzellen von 3 Spenderkälbern aus dem oben genannten Kontrollbetrieb E verwendet (**Tabelle 1**).

Die erste Beprobung erfolgte einheitlich zwischen dem 3. und 5. Lebenstag (**Tabelle 2**). Danach wurden Blutproben in unregelmäßigen Abständen bis zum 29. bzw. 32. Lebenstag (Spenderkälber 1 und 2) bzw. bis zum 78. Lebenstag (Spenderkalb 3) gezogen. Für diese Zeiträume wurden die Kälber in der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der JLU Gießen aufgestellt. Das Spenderkalb 1 war weiblich, die Spenderkälber 2 und 3 waren männlich. Das Spenderkalb 1 war aus einer Kreuzung zweier Milchviehrassen hervorgegangen, die Spenderkälber 2 und 3 gehörten der Rasse Deutsche Holstein schwarzbunt an.

Die Blutzellen von Spenderkalb 1 wurden in Vorversuchen zur Methoden-etablierung verwendet. Alle in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse im DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test bzw. DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Test wurden mit den Testzellen aus Blutproben der Spenderkälber 2 oder 3 ermittelt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutproben von Spenderkälbern und Rindern wurden im Rahmen des gemäß § 8 Abs. 1 TierSchG vom Regierungspräsidium Gießen genehmigten Versuchsvorhabens „Ätiopathogenese der bovinen neonatalen Panzytopenie“, Geschäftszeichen V 54 – 19 c 20-15 (1) GI 18/15-Nr. 34/2010, JLU-Nr. 488_GP entnommen. Weitere Blutprobenentnahmen erfolgten im Rahmen diagnostischer Maßnahmen der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der JLU Gießen (Klinikpatienten mit BNP, BNP-Problembestände, andere BVDV-Impfbetriebe).

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Spenderkälber

Kalb-Nr.	Geburtsdatum, Geschlecht	Beprobungszeitraum	Impfstatus der Mutter	Verwendung für
1	03.08.2010, weiblich	3. LT – 32. LT	BTV	Etablierung des DFZM-Allo-AK _{Leuko} -Tests
2	18.10.2010, männlich	5. LT – 29. LT	BTV	DFZM-Allo-AK _{Leuko} -Tests (Korrelation zwischen Spenderkälbern 2 und 3)
3	14.03.2011, männlich	3. LT – 78. LT	BTV	DFZM-Allo-AK _{Leuko} -Tests (Vergleich der verschiedenen Betriebe)

Erläuterungen:

- LT: Lebenstag
- BTV: *Bluetogues*-Virus
- DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test: Durchflusszytometrischer Test zum Nachweis von gegen Kälberleukozyten gerichteten Alloantikörpern

1.3 Probenmaterial

Serumproben

Die Blutentnahme für die Serumgewinnung erfolgte durch die Punktion der Schwanzvene. Das Blut wurde in 10 ml-Serumröhrchen aufgefangen und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Das Blut wurde am Tag der Entnahme in den Serumröhrchen bei 2.700 x g für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Tischkühlzentrifuge 4K15C, Fa. Sigma). Der Überstand (Serum) wurde abgenommen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Von allen Serumproben wurde jeweils ein Aliquot vor der Verwendung im DFZM-Allo-AK-Test und im Serum-Langsam-Agglutinationstest in einem Wasserbad bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert. In allen anderen Tests wurden nicht-hitzebehandelte Serumproben eingesetzt.

Blutproben

Von den Spenderkälbern wurden für die Gewinnung der Leukozyten und Thrombozyten Blutproben am jeweiligen Versuchstag aus der *Vena jugularis* entnommen. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen aufgefangen und bis zur Präparation der Blutzellen bei Raumtemperatur auf einem Schwenker aufbewahrt.

Kolostrumproben

Im Zeitraum von Oktober 2009 bis März 2011 wurden von 16 Kühen Kolostrumproben gesammelt. 7 Proben stammten von BNP-Muttertieren aus dem PregSure® BVD-Impfbetrieb A, 6 weitere Kolostrumproben stammten ebenfalls von Rindern aus dem PregSure® BVD-Impfbetrieb A, die jedoch kein BNP-Kalb geboren hatten. Die übrigen Kolostrumproben wurden von 3 Kühen aus dem Kontrollbetrieb E gewonnen. Alle Kolostrumproben wurden bei -20 °C gelagert. Vor ihrer Verwendung in der durchflusszytometrischen Untersuchung auf Allo-AK wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und jeweils ein Aliquot von 5 ml bei 3.299 x g für 10 min bei 20 °C zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge 4K15C, Fa. Sigma). Die auf der Oberfläche entstandene Fettschicht wurde entfernt und je 1 ml des „Milchserums“ in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert.

2 Verwendete Antikörper

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Tabelle 3: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Iso- typ	Klon/ Bestellnr.	Herkunft/ Bezug	Gebrauchs- verdünnung, -volumen	Klonalität
Schaf-anti-Rind-IgG, FITC-markiert	IgG	AAI23F	AbD Serotec, Düsseldorf	1:200, 50 µl	polyklonal
Schaf-anti-Rind-IgG ₁ , FITC-markiert	IgG ₁	AAI21F	AbD Serotec, Düsseldorf	1:200, 50 µl	polyklonal
Schaf-anti-Rind-IgG ₂ , FITC-markiert	IgG ₂	AAI22F	AbD Serotec, Düsseldorf	1:100, 50 µl	polyklonal
Schaf-anti-Rind-IgM, FITC-markiert	IgM	AAI19F	AbD Serotec, Düsseldorf	1:100, 50 µl	polyklonal
Maus-anti-Rind-MHC I	IgG _{2a}	IL-A88	IHIT, Zellkultur-überstand	unverdünnt, 50 µl	polyklonal
Maus-anti-Human-HLA (MHC I)	IgG _{2a}	W6/32	Institut für Virologie, JLU Gießen Zellkultur-überstand	1 : 100, 50 µl	polyklonal
Maus-anti-Rind-CD14	IgG ₁	CAM36A	VMRD	1 : 500, 50 µl	monoklonal
Maus-anti-Schaf CD41/CD61	IgG ₁	MCA1095G	AbD Serotec, Düsseldorf	1 : 800, 25 µl	monoklonal
Ziege-anti-Maus-IgG ₁ , APC-markiert	IgG ₁	115-135-205	Jackson Immuno Research	1 : 400, 25 µl (DFZM-Allo-AK _{Thrombo} -Test) 1:1.000, 50 µl (Phagozytose-test)	monoklonal

Erläuterungen:

- IHIT: Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen
- VMRD: *Veterinary Medical Research & Development* , Leipzig

3 BVDV-Neutralisationstest

Serumproben wurden von MitarbeiterInnen des Institutes für Virologie, JLU Gießen, auf neutralisierende Antikörper gegen BVDV-Typ 1 untersucht. Die Titer wurden als Kehrwerte der höchsten \log_{10} -Serumverdünnungen ermittelt, die noch eine 50 %-ige Neutralisation des Testvirus-Standards verursachten. Getestet wurden eine Auswahl an Serumproben von Kühen aus den PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B (n = 53), sowie alle Serumproben aus dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C (n = 50) und dem Bovidec®-Impfbetrieb D (n = 50).

4 Zellkulturmethoden

4.1 Zelllinien

BL-3-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten BL-3-Zellen wurden von Herrn Prof. Dr. Thiel vom Institut für Virologie der JLU Gießen zur Verfügung gestellt, nachdem sie dort negativ auf BVDV getestet worden waren. Ursprünglich stammt diese Zelllinie von Frau Dr. Julia Ridpath vom National Animal Disease Center, USDA, Agricultural Research Service, Ames, Iowa, USA (Prof. Dr. Thiel, Institut für Virologie, JLU Gießen, persönliche Mitteilung).

BL-3-Zellen sind eine permanente Lymphosarkomzelllinie vom Typ B-Lymphozyt, die in Suspension wachsen (ATCC® Nr. CRL-8037™). Die BL-3-Zellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (T 75, Fa. Greiner Bio-One GmbH) in BL-3-Medium fortlaufend kultiviert (37 °C, 5 Vol.% CO₂ und Wasserdampfsättigung). Die BL-3-Zellen wurden zur Weiterkultivierung bzw. für die Verwendung in den Versuchsansätzen regelmäßig alle 2 - 3 Tage ausgedünnt. Zu diesem Zweck wurde ein vorher festgelegtes Volumen der Zellsuspension aus der Flasche entnommen und durch die entsprechende Menge an Medium ersetzt. Die Splittrate betrug dabei je nach Zellwachstum 1:2 bis 1:10.

MDBK-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten MDBK-Zellen wurden ebenfalls vom Institut für Virologie der JLU Gießen zur Verfügung gestellt, nachdem sie dort negativ auf BVDV getestet worden waren. Bei MDBK-Zellen (Madin-Darby bovine kidney cells) handelt es

sich um eine adhäre Zelle, die ursprünglich aus Rindernierenzellen gewonnen wurde (ATCC® Nr. CCL-22TM).

Die Kultivierung der MDBK-Zellen erfolgte in Plastik-Zellkulturflaschen (T 75, Fa. Greiner Bio-One GmbH) bei 37 °C, 5 Vol.% CO₂ und Wasserdampfsättigung. Als Nährmedium diente RPMI-1640-Medium. Regelmäßig einmal pro Woche wurden die Zellen im Stadium eines dichten Monolayers nach folgendem Protokoll trypsinisiert und gesplittet, um sie zur Weiterkultivierung auszdünnen und die übrigen Zellen in den Versuchen einzusetzen. Hierzu wurden zunächst die Reste des Mediums durch Spülen der Flaschen mit 10 ml HEPES-Puffer entfernt. Um den Zell-Monolayer abzulösen, wurden jeweils 10 ml Trypsin-Gebrauchslösung pro Flasche zugegeben und die Flasche für 10 min bei 37° C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch anhand ihrer Abrundung und Vereinzelung kontrolliert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt und das gleiche Volumen an FKS-haltigem Medium nach Ausspülen der Kulturgefäße hinzugefügt. Dann erfolgte die Zentrifugation mit 202 x g bei 20° C für 7 min (Zentrifuge Sigma 4K15). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellpellets in jeweils 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Für den Einsatz in den durchflusszytometrischen Versuchen (s.u.) wurde daraus ein Aliquot zur Zellzählung entnommen. Je nachdem, welche Splittrate vorher festgelegt worden war, wurde die jeweils gewünschte Menge der Zellsuspension zur weiteren Kultivierung in die Flaschen zurückgegeben.

4.2 Gewinnung und Vorbereitung der Testzellen

Rinder-Leukozyten

Jedes 2.000 µl-Aliquot einer Vollblutprobe von Spenderkalb 2 oder 3 wurde in einem 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) mit 20 ml Erythrozytenlysispuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 20 ml PBS/EDTA versetzt, durch Schwenken gemischt und dann bei 200 x g für 7 min bei 20 °C zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge 4K15C, Fa. Sigma). Der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 20 ml PBS/EDTA wurde erneut resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets aus mehreren Einzelansätzen wurden nach dem Dekantieren der Überstände gemeinsam in 10 ml Waschlösung (PBS-Puffer + 0,01 % NaN₃) resuspendiert und dadurch vereinigt. Nach der erneuten Zentrifugation (s.o.) wurde das dabei entstandene Pellet in 1 ml Waschlösung aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur Lebend-Tot-Differenzierung wurde eine Stichprobe der

Suspension mit Trypanblau (1:20) gefärbt. Zur Verwendung in den durchflusszytometrischen Tests wurden Aliquots der Suspension mit jeweils 1×10^6 Zellen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden (Fa. Greiner Bio-One) überführt.

Rinder-Thrombozyten

Zur Herstellung von mit Rinder-Thrombozyten angereicherten Zellsuspensionen wurden EDTA-Blutproben von Spenderkalb 3 bei $150 \times g$ für 15 min bei 20°C zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge 4K15C, Fa. Sigma). Der dabei aus einer Blutprobe hergestellte thrombozytenreiche Überstand wurde abgenommen und auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Anschließend wurde die Zelllösung in jedem Gefäß mit Waschlösung auf 1,8 ml aufgefüllt, so dass ein Gesamtvolumen an thrombozytenreicher Zellsuspension von 3,6 ml für die Untersuchung im Durchflusszytometer zur Verfügung stand. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 50 μl pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden (Fa. Greiner Bio-One) überführt.

MDBK-Zellen

Beim routinemäßigem Splitten der MDBK-Zellen (siehe Punkt 4.1.2) wurde die im Überschuß vorhandene Zellsuspension für den Allo-AK-Test verwendet. Hierzu wurde die Zellzahl mittels Zählung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Für die durchflusszytometrische Messung wurden Aliquots der Suspension mit jeweils 1×10^6 Zellen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden überführt.

BL-3-Zellen

Die Herstellung von BL-3-Testsuspensionen erfolgt in Analogie zur Herstellung der MDBK-Testsuspensionen. Für die durchflusszytometrische Messung wurden Aliquots der Suspension mit jeweils 5×10^5 Zellen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden überführt.

4.3 Durchflusszytometrische Tests auf Allo-reaktive Antikörper (DFZM-Allo-AK-Tests)

4.3.1 DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test

Nach der Einsaat der Leukozyten in die 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden (Fa. Greiner Bio-One) erfolgte zuerst ein Zentrifugationsschritt (400 x g für 4 min bei 20 °C). Als Blocklösung wurde SuperBLOCK (Fa. Perbio Science) 1:10 verdünnt in Waschlösung (PBS-Puffer + 0,01 % NaN₃) eingesetzt. Hierzu wurden die Zellpellets in 50 µl Superblocklösung pro Vertiefung resuspendiert und dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten erneut zentrifugiert (s.o.) und die Überstände ausgeschlagen. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, indem sie mit 100 µl Waschlösung pro Vertiefung resuspendiert und erneut zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden verworfen. Die zu testenden Serumproben wurden 1:50 in Waschlösung verdünnt. Jedes Zellpellet wurde dann mit jeweils 50 µl der verdünnten Serumprobe resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jede Serumprobe wurde im Doppelansatz untersucht. Nach der Inkubationszeit schlossen sich ein weiterer Zentrifugations- und Waschschrift an. Die Inkubation der Zellen mit dem verwendeten Sekundärantikörper (FITC-konjugierter Schaf-anti-Rind-IgG-Antikörper, Gebrauchsverdünnung siehe **Tabelle 3**, inkl. 7-AAD-Stammlösung, Verdünnung 1:50) wurde über 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur durchgeführt. 7-AAD durchdringt die Zellmembran geschädigter Zellen und färbt intrazellulär DNA-Bestandteile an.

Es schlossen sich wieder je ein Zentrifugations- und Waschschrift an. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellpellets in 50 µl PBS pro Vertiefung resuspendiert und anschließend in FACS-Teströhrchen (Fa. Sarstedt), in die bereits 150 µl PBS-Puffer vorgelegt worden war, überführt.

4.3.2 DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Test

Nachdem die Vertiefungen der 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden (Fa. Greiner Bio-One) mit der Thrombozytensuspension beschickt worden waren, wurden die Platten zuerst zentrifugiert (1.500 x g für 5 min bei 4 °C).

Dann wurden pro Vertiefung 25 µl der verdünnten Serumprobe (1:25 verdünnt in Waschlösung) vorgelegt. Die Koinkubation von Zellen und Serumprobe erfolgte zeitgleich mit dem Primärantikörper CD41/61-IgG₁. Anschließend wurden 25 µl der

Primärantikörperlösung (1:400 verdünnt in Waschlösung) pro Vertiefung dazu pipettiert und mit der Zellsuspension sowie der Serumprobe vermischt, bevor die Platte für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Anschluss folgte eine erneute Zentrifugation, nach der die Thrombozyten mit 100 µl Waschlösung pro Vertiefung gewaschen wurden. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand ausgeschlagen, um die Thrombozyten danach in der Sekundärantikörperlösung zu resuspendieren (50 µl pro Vertiefung). Bei den Thrombozytentests wurden als Sekundärantikörper ein Ziege-Anti-Maus-IgG₁-APC-Antikörper zur Markierung des nicht-konjugierten CD41/61-Primärantikörpers, und ein Schaf-Anti-Rind-IgG-FITC-Antikörper zur Detektion der Allo-AK verwendet. Die Inkubationszeit betrug 20 min und wurde bei Dunkelheit und Raumtemperatur durchgeführt.

Nach dem Abzentrifugieren, Waschen und erneuten Zentrifugieren wurden die Thrombozytenpellets in 50 µl PBS suspendiert und in FACS-Teströhrchen (Fa. Sarstedt), in die bereits 150 µl PBS-Puffer vorgelegt worden war, überführt.

4.3.3 DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Test

Nach dem Einsetzen der BL-3-Zellen in die 96-Loch-Mikrotiterplatten mit V-Boden erfolgte zuerst ein Zentrifugationsschritt bei 400 x g für 4 min bei 20 °C. Nach Ausschlagen des Überstands wurden die BL-3-Pellets in 50 µl BL-3-Waschlösung pro Vertiefung resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll des DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Tests, mit dem Unterschied, dass für die BL-3-Zellen durchgängig die BSA-haltige BL-3-Waschlösung anstelle der sonst üblichen Waschlösung ohne BSA verwendet wurde.

4.3.4 DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test

Serumproben

Nach dem Einsetzen von 1×10^6 MDBK-Zellen pro Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden wurde der DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test analog zum DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test (s.o.) durchgeführt.

Kolostrumproben

Bei den Untersuchungen der Kolostrumproben auf ihren Allo-AK-Titer wurden im DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test anstelle der Serumproben die Kolostrumproben eingesetzt, die wie zuvor unter Punkt III.1.5 behandelt worden waren. In Analogie zu den

Serumproben wurden die Kolostrumproben für den Test 1:50 in Waschlösung verdünnt.

4.3.5 Kompetitiver DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test

Zur Überprüfung der Hypothese, wonach die PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK gegen MHC I-Moleküle gerichtet sind (Deutkens *et al.* 2011), wurde ein kompetitiver DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test mit den monoklonalen Antikörpern IL-A88 (Zellkulturüberstand, IHIT JLU Gießen) und W6/32 (Zellkultur-überstand, Institut für Virologie, JLU Gießen) durchgeführt. IL-A88 ist gegen bovines MHC I gerichtet. W6/32 reagiert gegen humanes MHC I (HLA), bindet aber auch an MHC I der Spezies Rind (Anonym 2013).

In den kompetitiven Testansätzen wurde mit der DFZM-Methodik geprüft, ob sich die Bindung von IL-A88 bzw. W6/32 an MDBK-Zellen durch Allo-AK aus Seren inhibieren lässt, wenn man diese zuerst an die Zielzellen binden lässt. In Vorversuchen war zunächst sichergestellt worden, dass IL-A88 und W6/32 an die Zelloberfläche von MDBK-Zellen banden und dementsprechend zu deutlichen Signalen im DFZM-Test führten. In diesen Vorversuchen wurden auch die optimalen Antikörperverdünnungen bestimmt (IL-A88 unverdünnt, W6/32 1:100).

Der kompetitive DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test wurde wie der DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test durchgeführt, wobei die Serumproben in den Verdünnungsstufen 1:12,5 und 1:25 eingesetzt wurden.

Nach der Inkubation mit den entsprechenden Serumproben fand die Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern IL-A88 und W6/32, ebenfalls für 30 min bei Raumtemperatur, statt. Von diesen Antikörpern wurden 50 µl pro Vertiefung unverdünnt (IL-A88) bzw. 1:100 verdünnt (W6/32) eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein APC-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG_{2a}-Antikörper in einer 1:400-Verdünnung in Waschlösung verwendet. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 30 min. Als Kontrollansätze für die Bindung von IL-A88 bzw. W6/32 an MDBK-Zellen dienten Ansätze ohne Serumzugabe.

Auswertstrategie und Analyse des kompetitiven DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Tests

Die MDBK-Zellen wurden wie im DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test (siehe Punkt 4.3.6) im Durchflusszytometer gemessen und ein elektronisches Auswertfenster erstellt. Für jede Probe wurde in den kompetitiven Tests die MFI des APC-Signals analysiert. Die Werte

der Kontrollansätze ohne Serumzugabe wurden als Bezugsgröße verwendet und als 100 %-ige Bindung betrachtet. Für jeden Testansatz (Ansatz mit Serumprobe) wurde berechnet, zu wieviel Prozent eine Bindung der monoklonalen anti-MHC I-Antikörper im Vergleich zum Kontrollansatz (Ansatz ohne Serumprobe) stattfand. Anschließend wurde aus den Werten der Allo-AK-haltigen Seren und denen der Allo-AK-negativen Seren jeweils der arithmetische Mittelwert bestimmt.

4.3.6 Auswertstrategie und Analyse

Alle Proben im DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test, im (kompetitiven) DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test, im DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Test und im DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Test wurden im FACSCalibur™-Gerät (Fa. Becton Dickinson) gemessen. Dabei wurden im DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test 10.000-Ereignisse im Lymphozyten-Auswertfenster R1 erfasst. Bei Verwendung von MDBK-Zellen wurden 20.000 Ereignisse vermessen und bei BL-3-Zellen und Thrombozyten als Testzellen je 15.000 Ereignisse. Zur Analyse wurde das gerätespezifische EDV-Programm „Cell Quest Pro“ verwendet, zur Auswertung der Daten wurde das Programm FCS Express (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Ontario, Kanada) zur Hilfe genommen.

Im ersten Analyseschritt wurden die Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, bzw. Thrombozyten, MDBK-Zellen oder BL-3-Zellen, differenziert nach ihrer Größe und Granularität im Vorwärts-/Seitwärtslichtstreuung-Zytogramm dargestellt. Anhand dieser Darstellung wurde für jede Zellart ein elektronisches Auswertfenster erstellt, in dem diejenigen Ereignisse lagen, die weiter analysiert wurden. Die Auswertstrategie und Analyse für die Leukozytenpopulationen ist in **Abbildung 1** dargestellt. **Abbildung 2** zeigt die Vorgehensweise, wenn MDBK- und BL-3-Zellen als Testzellen verwendet wurden und **Abbildung 3** das Vorgehen bei Verwendung von Thrombozyten. Anschließend wurden für jede Zellpopulation einzeln die im jeweiligen Auswertfenster gelegenen Ereignisse und ihre Messdaten in einem Histogramm dargestellt. Dabei war die Anzahl der Ereignisse (Ordinate) gegen die gemessene, FITC-bedingte Fluoreszenzintensität des Ereignisses (Abszisse) aufgetragen. Für jede gemessene Probe wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt, die aus den geometrischen Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten aller im Auswertfenster gelegenen Ereignisse einer Probe bestimmt wurde. Die Werte aus Doppel- und Mehrfachansätzen wurden sodann arithmetisch gemittelt. Aus der MFI, die auf diese Weise für jede Serumprobe ermittelt wurde, wurde in einem weiteren Rechenschritt der Allo-AK-Titer (Allo-AK-Titer) dieser Serumprobe bestimmt, indem deren MFI gegen die arithmetisch

gemittelte MFI von drei mitgeführten Negativ-Kontrollseren normalisiert wurde. Der Allo-AK-Titer wurde dabei nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Allo-AK-Titer} = \frac{\text{MW MFI (Serumprobe)}}{\text{MW MFI (Kontrollseren)}}$$

Bei den Messergebnissen der Thrombozyten wurde der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen (d.h. CD41/CD61- und Allo-AK-positive Zellen) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität des FITC-Signals der CD41/CD61-positiven Ereignisse bestimmt. Die letztgenannte Messgröße wurde hier zur Berechnung von Allo-AK-Titern verwendet. Die Berechnung erfolgte in Analogie zu der oben beschriebenen Vorgehensweise.

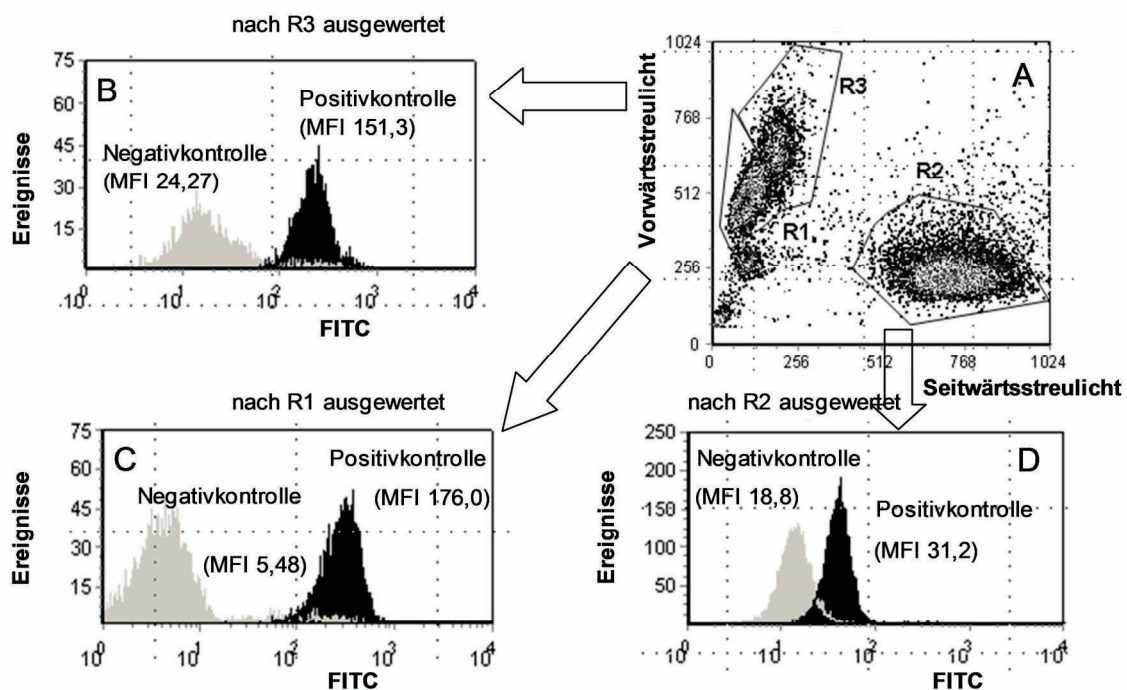


Abbildung 1: DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test: Auswertstrategie und Analyse für den Nachweis von Alloantikörpern mit bovinen Leukozyten als Testantigen.

Für Lymphozyten (R1), Granulozyten (R2) und Monozyten (R3) wurden im ersten Schritt anhand ihrer Vorwärts (FSC)- und Seitwärtstreulicht (SSC)-Werte spezifische Auswertfenster definiert [A]. Diese Fenster waren die Grundlage dafür, um im nächsten Schritt zelltypspezifisch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der in diesem Fenster gelegenen Ereignisse zu ermitteln. Die Abbildung zeigt beispielhaft die MFIs von Monozyten [B], Lymphozyten [C] und Granulozyten [D] nachdem sie entweder mit einer fraglichen Serumprobe (hier: ein Positivkontrollserum von einer BNP-Mutter) oder

einem Negativkontrollserum (Nicht-BNP-Mutter, nicht gegen BVDV-geimpft) inkubiert worden waren.

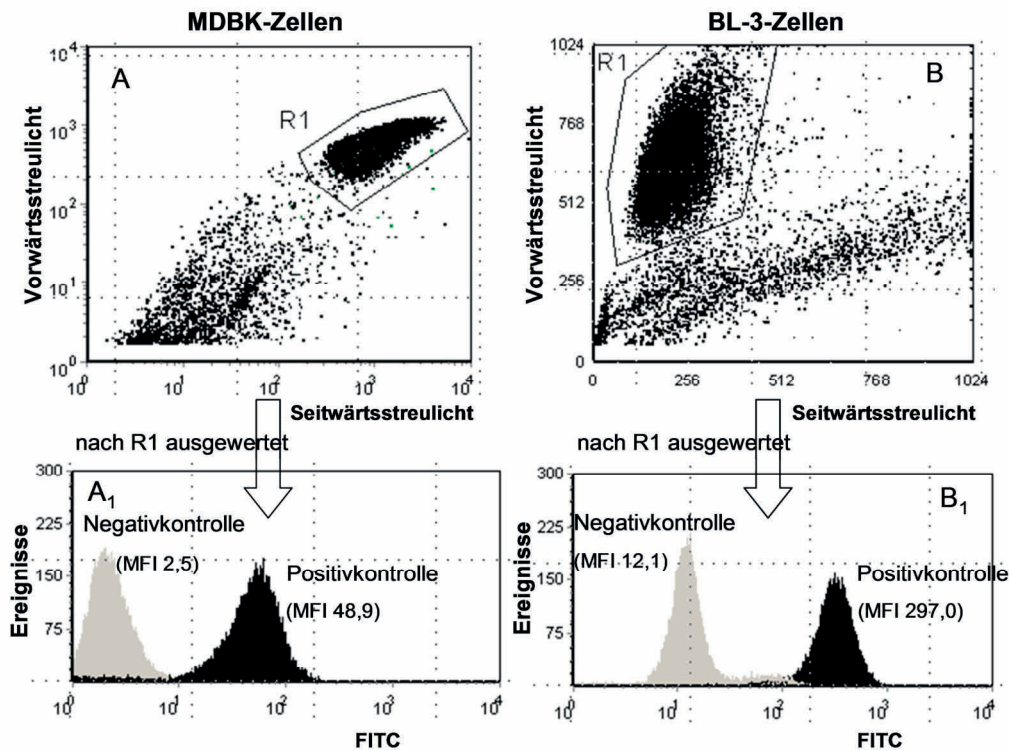


Abbildung 2: DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test und DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Test: Auswertstrategie und Analyse für den Nachweis von Alloantikörpern mit MDBK- bzw. BL-3-Zellen als Testantigen.

Für MDBK-Zellen [A] oder BL-3-Zellen [B] wurden im ersten Schritt anhand ihrer Vorwärts (FSC)- und Seitwärtstreulicht (SSC)-Werte spezifische Auswertfenster definiert [A]. Diese Fenster waren die Grundlage dafür, um im nächsten Schritt zelltypspezifisch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der in diesem Fenster gelegenen Ereignisse zu ermitteln. Die Histogramme zeigen beispielhaft die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von MDBK-Zellen [A₁] und BL-3-Zellen [B₁] nach Inkubation mit einem Positivkontrollserum (BNP-Mutter) und einem Negativkontrollserum (Nicht-BNP-Mutter, nicht gegen BVDV-geimpft).

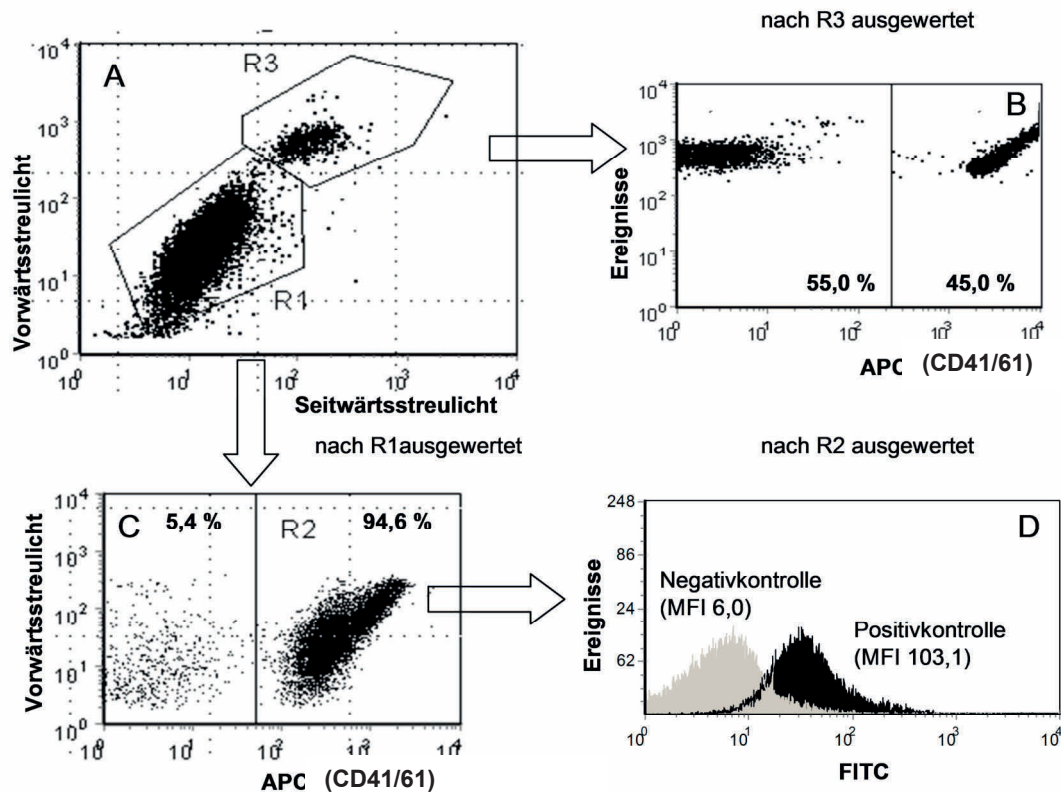


Abbildung 3: DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Test : Auswertstrategie und Analyse für den Nachweis von Alloantikörpern mit bovinen Thrombozyten als Testantigen.

Für Thrombozyten-angereichertes Plasma wurde im ersten Schritt anhand der Vorwärts (FSC)- und Seitwärtstreulicht (SSC)-Werte zwei spezifische Auswertfenster R1 und R3 definiert [A]. Diese Fenster waren die Grundlage dafür, um im nächsten Schritt zelltypspezifisch die APC-bedingte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der in diesen Fenstern gelegenen Ereignisse zu ermitteln. Zellen in R1 waren zu 94 % positiv für den Thrombozytenmarker CD41/CD61 [C]. Deshalb wurde für diese APC-positiven Zellen ein weiteres Auswertfenster R2 definiert und die in diesem Fenster gelegenen Ereignisse zur Berechnung der Allo-AK-Titer der Serumproben herangezogen. Das Histogramm [D] zeigt beispielhaft die FITC-bedingten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Ereignisse in R2 nach Inkubation mit einem Positivkontrollserum (BNP-Mutter) und einem Negativkontrollserum (Nicht-BNP-Mutter, nicht gegen BVDV-geimpft).

Die Partikel (Ereignisse) in R3 waren größer und granulierter als die Zellen in R1 und nur zum Teil (ca. 55 %) positiv für CD41/61. Diese Partikel wurden daher nicht als typische Thrombozyten angesehen und nicht weiter betrachtet. Bei diesen Partikeln könnte es sich um Thrombozyten-Aggregate gehandelt haben.

4.3.7 Bestimmung von Immunglobulinklassen und –subtypen der alloreaktiven Antikörper

Um die Allo-AK hinsichtlich der Immunglobulinklasse bzw. des IgG-Subtyps zu klassifizieren, wurden 28 Allo-AK-positive und 32 Allo-AK-negative Serumproben ausgewählt. Positive und negative Seren wurden im DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test unter der Verwendung von verschiedenen Sekundärantikörpern miteinander verglichen. Die eingesetzten Sekundärantikörper waren gegen IgG, IgG₁, IgG₂ und IgM (**Tabelle 3**) gerichtet.

4.4 Serumlängsamagglutinationstest (SLA-Test)

Für den Serumlängsamagglutinationstest (SLA-Test) wurden BL-3-Zellen als Testantigen eingesetzt. Aus der beim routinemäßigem Splitten der BL-3-Zellen (siehe Punkt 0) im Überschuss vorhandenen Zellsuspension wurden nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer die benötigten Testzellen für den SLA-Test gewonnen. Bei diesem Test wurden BL-3-Zellen mit den zu testenden Serumproben für 24 h in 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten (Fa. Nunc) inkubiert. Die Auswertung erfolgte makroskopisch anhand der gebildeten Agglutinate.

1. Komponente

In jede Testvertiefung der 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Fa. Nunc) wurden 2×10^5 BL-3-Zellen in 37,5 µl BL-3-Medium vorgelegt.

2. Komponente

Als *Blocking*-Substanz wurde pro Vertiefung 37,5 µl 4 %-iges BSA verwendet, die Endkonzentration betrug somit 1 %.

3. Komponente

Im SLA-Test wurde jede Serumprobe im Doppelansatz getestet. Die Verdünnung der hitzeinaktivierten Serumproben erfolgte in BL-3-Medium. Die Ausgangsverdünnung einer Serumprobe richtete sich nach dem für dieses Serum ermittelten Allo-AK-Titer im DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Test. Negative Seren wurden mit einer Ausgangsverdünnung von 1:4 eingesetzt.

Die weitere Verdünnung erfolgte einheitlich in \log_2 -Schritten über 8 Stufen. Die Serumverdünnungsreihen wurden zuvor in separaten Mikrotiterplatten angesetzt und per Mehrkanalpipette auf die Testplatten übertragen. Von jeder Verdünnungsstufe

wurden 75 µl pro Vertiefung eingesetzt. Als Kontrollen wurden auf jeder Platte ein stark positives (KL-4) und ein negatives Kontrollserum (KL-12) als Verdünnungsreihe über 8 Stufen mitgeführt. Das positive Kontrollserum wurde ab einer Anfangsverdünnung von 1:32 eingesetzt, das negative Kontrollserum ab 1:4.

Die Platten wurden dann für 24 h bei 37 °C bei 5 Vol.% CO₂ und Wasserdampfsättigung bebrütet.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach Ablauf der 24-stündigen Inkubation makroskopisch mit Hilfe eines Spiegels (Fa. TitertekTM, Microtitration Equipment, Flow Laboratories).

Der Inhalt in jeder Vertiefung wurde individuell beurteilt. Dabei wurden Agglutinate vor einem klaren Hintergrund als positiv bewertet, wohingegen Agglutinate bei trübem Grund nicht berücksichtigt und als negativ angesehen wurden. Ein homogener Inhalt ohne Agglutinate in der Vertiefung galt als negativ. Für jede getestete Serumprobe wurde als Titer der Kehrwert der jeweils höchsten Verdünnungsstufe angegeben, bei der noch mindestens einer der beiden Ansätze positiv war.

4.5 Zytotoxizitätstest (MTT-Test)

Mit dem kolorimetrischen MTT-Test wurde versucht, eventuelle zytotoxische Effekte der Allo-AK auf die als Testzellen eingesetzten MDBK-Zellen qualitativ und quantitativ zu erfassen. MTT ist ein Tetrazoliumsalz, das nur von lebenden Zellen reduziert werden kann (Green *et al.* 1984). 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT, Fa. Sigma-Aldrich) wird dabei von den Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zu einem violettfarbenen Formazan umgesetzt. Dieser Umsatz wird als „Stoffwechselaktivität“ bezeichnet. Der MTT-Test hier wurde in Anlehnung an die Modifikation von Tada *et al.* durchgeführt (Tada *et al.* 1986). Um eine Komplement-vermittelte zytotoxische Wirkung der Allo-AK nachweisen zu können, wurde Meer-schweinchenkomplement (Fa. Siemens Healthcare) als zusätzliche Komplementquelle verwendet.

Testansatz

Jeder Reaktionsansatz im MTT-Test setzte sich aus drei Komponenten à 50 µl Flüssigkeitsvolumen zusammen, welche nacheinander in die Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Flachboden (Fa. Nunc) pipettiert wurden.

Die **erste Komponente** bestand aus einer Suspension von MDBK-Zellen in RPMI-1640-Medium (5×10^4 Zellen in 50 µl pro Vertiefung).

Als **zweite Testkomponente** wurde die zu testende Serumprobe in definierter Verdünnung in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei wurde jede Serumprobe in einer \log_2 -Verdünnungsreihe über 6 Stufen und diese im Doppelansatz getestet. Die Verdünnungsreihe wurde mit RPMI-1640-Medium hergestellt, beginnend mit einer Verdünnung von 1:12. Dafür wurden die Serumproben 1:4 in RPMI-1640-Medium vorverdünnt. Im fertig pipettierten Reaktionsansatz lagen die Serumproben folglich in endgültigen Verdünnungen von 1:12, 1:24, 1:48, 1:96, 1:192 und 1:384 vor. Wenn sich die toxische Wirkung einer Serumprobe mit dieser Verdünnungsreihe nicht ausverdünnen ließ, wurden zusätzlich höhere Verdünnungen getestet.

Als Positivkontrolle wurden MDBK-Zellen in RPMI-1640-Medium verwendet, die durch die Zugabe von 1 %-igem SDS in 0,89 % NaCl zerstört wurden, als Negativkontrolle dienten MDBK-Zellen in RPMI-1640-Medium, denen anstelle einer Serumprobe ein Negativpoolserum bestehend aus hitzeinaktivierten Serumproben (KL-10, KL-11, KL-12) von nicht gegen BVDV-geimpften Kühen aus BVDV-unverdächtigen Betrieben zugegeben wurde. Die Serumproben, die zur Herstellung des Negativpoolserums verwendet wurden, waren zuvor im DFZM-Allo-AK-Test mit negativem Ergebnis getestet worden.

Als **dritte und letzte Komponente** wurde zu jeder Vertiefung 50 µl verdünntes Meerschweinchenkomplement zugegeben. Dafür wurde das Komplement 1:5 mit RPMI-1640-Medium vorverdünnt. Die Endkonzentration betrug somit in jedem Testansatz 7 % (v/v). Die optimale Komplementkonzentration war zuvor in einem Titrationsversuch ermittelt worden. Ebenso wurden auch Versuchsansätze ohne Komplementzusatz getestet. Ein toxischer Effekt des Meerschweinchenkomplements *per se* konnte durch eine Komplementkontrolle (Reaktionsansätze aus MDBK-Zellen und Komplementverdünnung ohne Zugabe einer Serumprobe) ebenfalls zuvor ausgeschlossen werden.

Für den MTT-Test wurden nur die inneren 60 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verwendet. Die äußeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 100 µl

NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz beschickt. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte für 48 h Stunden (37 °C, 5 Vol.% CO₂, Wasserdampfsättigung).

Messung

Nach der Inkubation wurden zu jedem Ansatz 25 µl der MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS-Puffer) pipettiert und die Mikrotiterplatte unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert (4 h, 37 °C). Zum Abstoppen der Reaktion durch Zerstörung der Zellen und zum Lösen des in wässriger Lösung unlöslichen Formazans wurden 100 µl einer 10 %-igen SDS-Lösung in 0,01 N HCl in jede Vertiefung gegeben. Anschließend wurde die Schwenk-Inkubation über Nacht fortgeführt. Die optische Dichte der Reaktionsansätze wurde schließlich mit einem ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Multiscan Ascent, Fa. Labsystems) gemessen, wobei die Testwellenlänge 540 nm und die Referenzwellenlänge 690 nm betrug.

Auswertung

Für jede im MTT-Test geprüfte Serumprobe wurde anhand der Messwerte die zytotoxische Aktivität errechnet und als Vielfaches der zu 50 % zytotoxischen Dosis je Milliliter Serumprobe angegeben (Einheit: CD₅₀/ml).

Zunächst wurde die absolute optische Dichte (OD_{abs}) eines Reaktionsansatzes ermittelt, indem die beiden Messwerte der Doppelansätze arithmetisch gemittelt wurden.

Für jeden Reaktionsansatz wurde dann die relative optische Dichte (OD_{rel}) errechnet, die ein normalisiertes Maß für die Stoffwechselaktivität der mit Serumproben inkubierten MDBK-Zellen darstellte. Dazu wurden die absoluten optischen Dichten der Reaktionsansätze nach folgender Formel auf die absoluten optischen Dichten der Positiv- (OD_{pos}) und der Negativkontrolle (OD_{neg}) in der jeweiligen Mikrotiterplatte bezogen:

$$OD_{rel} [\%] = (OD_{abs} - OD_{pos}) / (OD_{neg} - OD_{pos}) \times 100$$

Im nächsten Schritt wurde die relative Zellaktivität (OD_{rel}, Ordinate) gegen die log₂-Verdünnungsstufe (Abszisse) der betreffenden Serumprobe in einem Koordinatensystem aufgetragen (siehe **Abbildung 4A**).

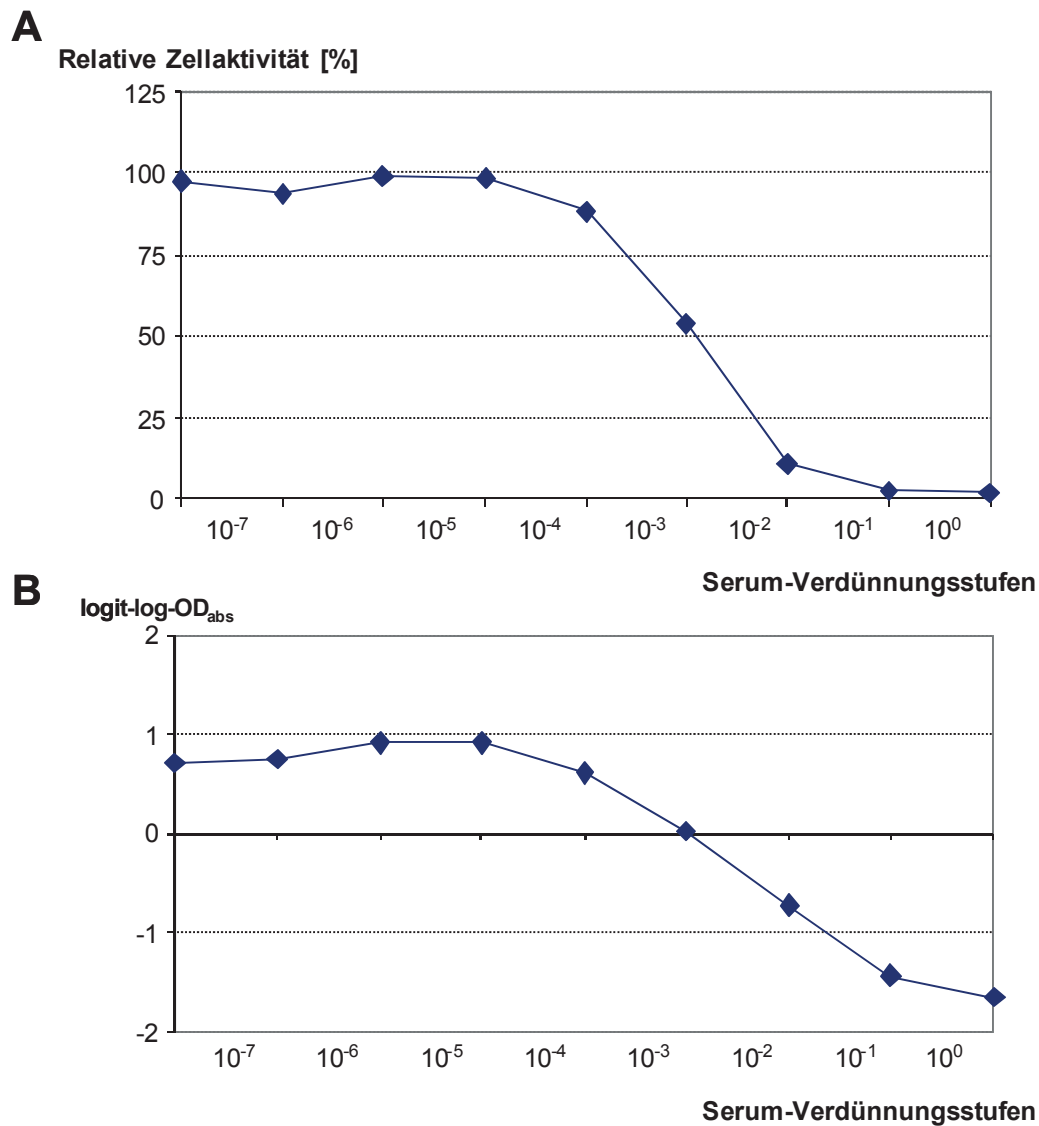


Abbildung 4: Dosisabhängige Zytotoxizität einer Serumprobe gegenüber MDBK-Zellen

(Ergebnisse des MTT-Tests; Beispiel mit \log_{10} -Serumverdünnungsreihe)

- A: Relative Zellaktivität (OD_{rel}) in % in Abhängigkeit von der jeweiligen \log_{10} -Verdünnungsstufe der titrierten Serumprobe.
- B: Grafische Darstellung der oben gezeigten OD_{abs} -Werte nach logit-log-Transformation. In die Berechnung zur Ermittlung des Schnittpunktes der Geraden mit der x-Achse (entspricht der Serumverdünnung, bei der eine 50 %-ige Zellaktivität vorliegt) gehen zwei logit-log- OD_{abs} -Werte ober- und unterhalb des Schnittpunktes mit der x-Achse ein.

Anschliessend wurden die ermittelten OD_{abs}-Werte einer logit-log-Transformation unterzogen, um den mittleren, S-förmigen Abschnitt dieser Kurve annähernd zu begradigen (Berechnung mit „Microsoft® Excel 2010“). Hierzu wurde als Untergrenze (UG) die OD_{abs} der Positivkontrolle (OD_{pos}) eingesetzt, sofern alle OD_{rel}-Werte der betreffenden Probe ≥ 0 % lagen. War dies nicht der Fall, wurde der kleinste OD_{abs}-Wert minus 0,001 als Untergrenze festgesetzt. Als Obergrenze (OG) wurde die OD_{abs} der Negativkontrolle (OD_{neg}) eingesetzt, falls alle OD_{abs} einen Wert von ≤ 100 % aufwiesen. Traf dies nicht zu, wurde der größte OD_{abs}-Wert plus 0,001 als Obergrenze definiert. Die logit-log-Transformation aller OD_{abs}-Werte der Probe erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{logit-log-OD}_{\text{abs}} = \log_{10} [(OD_{\text{abs}} - UG) / (OG - OD_{\text{abs}})]$$

Abbildung 4B zeigt den Kurvenverlauf nach der logit-log-Transformation der OD_{abs}-Werte. Im nächsten Schritt wurde anhand der ermittelten logit-log-OD_{abs}-Werte derjenige Punkt der Kurve ermittelt, bei dem die relative Zellaktivität 50 % betrug. Dies entspricht dem Schnittpunkt der Kurve mit der x-Achse (**Abbildung 4B**). Zur Berechnung der zytotoxischen Aktivität der betreffenden Serumprobe in CD₅₀/ml wurden dann die zwei Messwerte oberhalb und zwei Messwerte unterhalb dieses Schnittpunktes und die ihnen zugrundeliegenden Verdünnungsstufen herangezogen. Es wurden nur dann weniger Messwerte in die Berechnung einbezogen, wenn Werte innerhalb der linearisierten Kurve nicht kontinuierlich anstiegen (Editierung der logit-log-transformierten Werte).

Mittels „Microsoft® Excel 2010“ wurden anschließend die Steigung „m“ und der y-Achsenabschnitt „b“ des entsprechenden Kurvenabschnittes nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Steigung } m = \text{INDEX (RGP(A:B;C:D);1)}$$

$$\text{y-Achsenabschnitt } b = \text{INDEX (RGP(A:B;C:D);2)}$$

Dabei war A der kleinste gültige logit-log-OD_{abs}-Wert, B der größte gültige logit-log-OD_{abs}-Wert, C der Exponent der log₁₀-Verdünnungsstufe des kleinsten gültigen logit-log-OD_{abs}-Wertes und D der Exponent der log₁₀-Verdünnungsstufe des größten gültigen logit-log-OD_{abs}-Wertes.

Mit „m“ und „b“ wurde dann die zytotoxische Aktivität in CD₅₀/Vertiefung mit der Formel

$$\text{Zytotoxische Aktivität [CD}_{50}\text{/Vertiefung]} = x(b/m)$$

berechnet. X stellt in diesem Fall die Basis der logarithmischen Verdünnung dar, z.B. 10 bei einer \log_{10} -Verdünnungsreihe. Dieser Schritt ermöglichte es, die log-Verdünnungsstufe zu extrapolieren, bei der die transformierte Kurve die x-Achse schneidet, d. h. die Zellaktivität auf genau 50 % reduziert worden wäre.

Nachfolgend wurde durch Multiplikation des errechneten Wertes mit 20 die zytotoxische Aktivität in CD_{50}/ml ermittelt:

$$\text{Zytotoxische Aktivität } [CD_{50}/ml] = CD_{50}/\text{Vertiefung} \times 20$$

4.6 Apoptose- und Nekrosetest

Zur Untersuchung der Rinderserumproben auf eine eventuelle apoptotische Wirkung wurde das kommerziell erhältliche *Annexin V-FITC Assay Kit* (Fa. AbD Serotec) verwendet.

Testansatz

Die Durchführung des Tests folgte den Herstellerangaben. Lediglich die Arbeitsvolumina der *Binding Buffer*-, der *Annexin-V-FITC*- und der Propidiumiodid (PI)-Lösung wurden für die hier beschriebenen Untersuchungen leicht verringert (statt 195 μl bzw. 200 μl wurden je 150 μl pro Vertiefung der Mikrotiterplatte verwendet). Als Testzellen wurden MDBK-Zellen in 100 μl RPMI-1640-Medium in einer Zellzahl von 5×10^5 pro Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Flachboden (Fa. Nunc) vorgelegt. Diese Suspensionen wurden dann mit je 100 μl der verdünnten fraglichen Serumprobe (1:10 in *Binding Buffer*-Lösung vorverdünnt) vermischt. Die am Rand der Platte gelegenen Vertiefungen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit je 100 μl 0,89 %-ige NaCl-Lösung beschickt. Die anschließende Inkubation dauerte 72 h bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 Vol.% CO_2 . Als Positivkontrollen wurden MDBK-Zellen abweichend von den Herstellerempfehlungen mit 0,25 %-iger Formaldehydlösung inkubiert, jeweils als 72 h- und als 4 h-Ansatz. Wegen der flüchtigen Eigenschaften des Formaldehyds wurden die Testansätze mit Serumproben und die Positivkontrollen auf verschiedenen Platten angesetzt und in getrennten Brutschränken inkubiert. Als Negativkontrollen dienten MDBK-Zellen in RPMI-1640-Medium ohne Serum. Nach der Inkubation wurden aus jeder Vertiefung vorsichtig 150 μl des Überstands abgenommen und anschließend 150 μl Accutase®-Lösung (Fa. PAA Laboratories) hineinpipettiert, um die adhärennten MDBK-Zellen zu lösen. Daran schloss sich eine Inkubation von 60 min bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 Vol.% CO_2 an. Danach wurde der Inhalt in allen Vertiefungen

resuspendiert und 1:1 in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit V-Boden (Fa. Greiner Bio-One) überführt. Diese Platte wurde mit 400 x g bei 20 °C für 4 min zentrifugiert und die Überstände dann ausgeschlagen. Es folgte ein Waschschriff mit je 150 µl *Binding Buffer-Lösung* (1:4 in *A. dest.* verdünnt) pro Vertiefung. Nach erneuter Zentrifugation (400 x g, 20 °C, 4 min) und Ausschlagen der Überstände wurden die Zellen je nach Ansatz in jeweils 150 µl Annexin-V-FITC (1:40 in *Binding Buffer-Lösung* verdünnt) bzw. in jeweils 150 µl *Binding Buffer-Lösung* resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde erneut zentrifugiert und gewaschen. Pro Vertiefung wurden dann 150 µl Propidiumiodid-Lösung (1:20 in *Binding Buffer-Lösung* verdünnt) zugegeben, die Zellen darin gut resuspendiert und die Ansätze zur Messung im Durchflusszytometer in FACS-Röhrchen überführt, in denen jeweils 100 µl PBS-Puffer vorgelegt waren.

Messung und Auswertung

Alle Testansätze wurden im FACSCalibur™-Gerät (Fa. Becton Dickinson) analysiert. Dazu wurden von jedem Testansatz 15.000 Ereignisse gemessen. Zur Analyse wurde das gerätespezifische EDV-Programm „Cell Quest Pro“ verwendet, zur Auswertung der Daten das Programm FCS Express (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Ontario, Kanada).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse diente Annexin-V-FITC als Marker für apoptotische Zellen und Propidiumiodid (PI) zur Erkennung nekrotischer Zellen. Annexin-V-FITC bindet an membranständige Phosphatidylserine (PS) in Anwesenheit von Ca^{2+} . PS werden in frühen Stadien der Apoptose an der Zelloberfläche exprimiert, weshalb der Nachweis dieser PS eine sehr sensitive Methode darstellt, um Apoptose schon zu erkennen, bevor Kernveränderungen wie DNA-Brüche eintreten (van Engeland *et al.* 1998). Durch die FITC-Markierung des Annexins zeigen apoptische Zellen eine grüne Fluoreszenz (Emmissionsmaximum bei 525 nm), die im Durchflusszytometer quantitativ erfasst werden kann (<http://www.fluorophores.tugraz.at>). Propidiumiodid (PI) ist ein Totfarbstoff, der die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann. Somit werden von PI nur tote Zellen angefärbt (van Engeland *et al.* 1998). Die Verwendung von PI (Emmissionsmaximum bei 617 nm) als zweiten Marker dient zur Identifizierung von nekrotischen Zellen (<http://www.fluorophores.tugraz.at>).

Die MDBK-Zellen wurden im Durchflusszytometer anhand der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten bei Lichtwellenlängen von 518 nm (Annexin-V-FITC) und von 617 nm (PI) analysiert. Lebende Zellen zeigten keine Fluoreszenz und befanden sich

im entsprechenden Zytogramm (**Abbildung 5B**) im unteren linken Quadranten. Apoptotische Zellen stellten sich als gleichzeitig Annexin-V-FITC-positiv und PI-negative Ereignisse im oberen linken Quadranten dar. Zellen in der rechten Hälfte des Zytogramms sind PI-positiv und galten somit als nekrotisch. Dabei wurden Zellen, die sowohl Annexin-V-FITC- als auch PI-positiv waren, gemäß Herstellerangaben ebenfalls als nekrotisch eingestuft. Jede fragliche Serumprobe wurde im Doppelansatz getestet. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurden alle Serumproben mit den gleichen Auswertfenstern (vorgegebenes Messlayout) gemessen. Als Apoptose/Nekrose-Positivkontrolle wurde Formalin anstelle der Serumprobe eingesetzt. Die Werte dieser Kontrollansätze flossen jedoch nicht in die Auswertung anhand der Auswertfenster mit ein. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Zugabe einer Serumprobe.

Zur Auswertung wurde für jeden Testansatz der Prozentsatz an apoptotischen, nekrotischen und lebenden MDBK-Zellen berechnet.

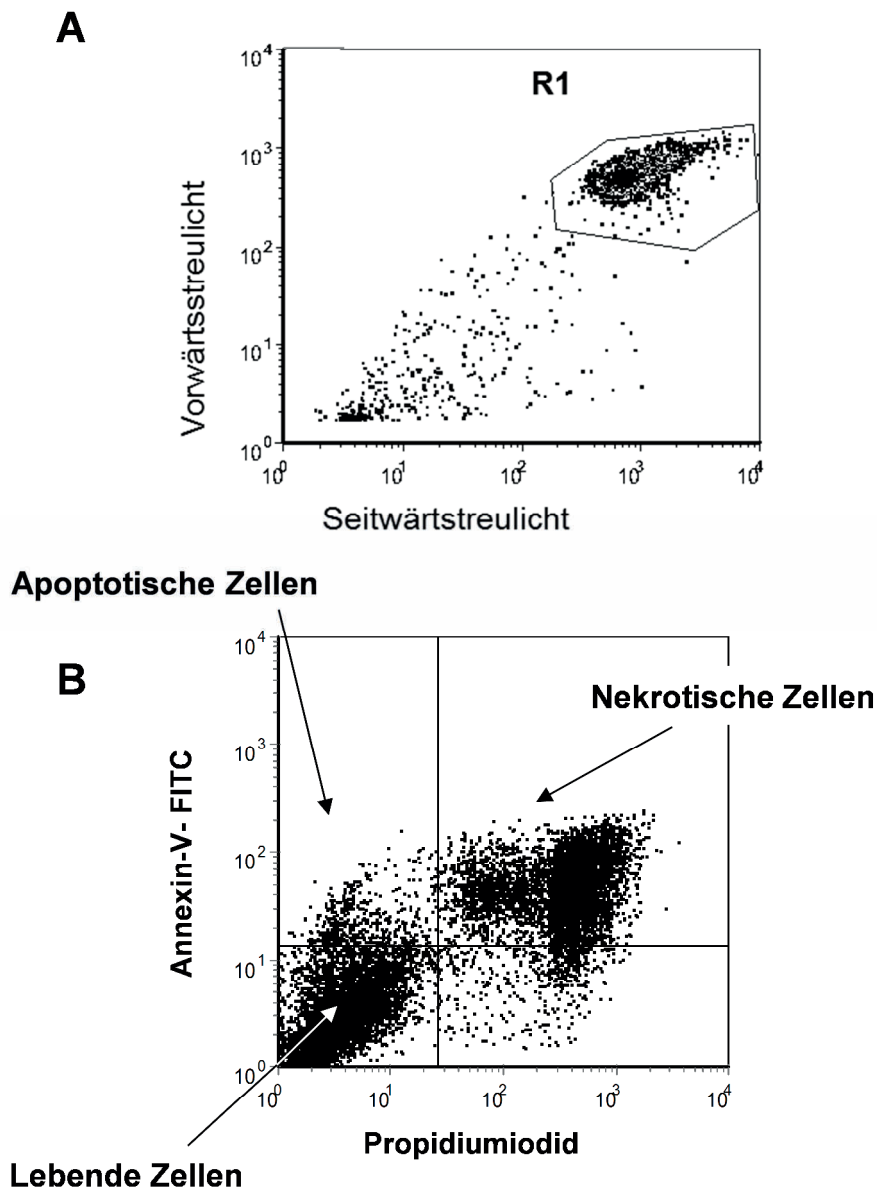


Abbildung 5: Auswertung des Apoptose- und Nekrosetests mittels Durchflusszytometrie

Für MDBK-Zellen wurde im ersten Schritt anhand ihrer Vorwärts (FSC)- und Seitwärtstreulicht (SSC)-Werte ein spezifisches Auswertfenster R1 definiert [A].

Dieses Fenster war die Grundlage dafür, um im nächsten Schritt die in R1 gelegenen Zellen anhand der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten des Annexin-V-FITC und des PI zu analysieren [B]: Lebende Zellen zeigen keine Fluoreszenz und befinden sich im unteren linken Quadranten, apoptotische Zellen sind Annexin-V-FITC-positiv und stellen sich im oberen linken Quadranten dar. Zellen in der rechten Bildhälfte sind PI-positiv und somit nekrotisch. Zellen mit einer doppelt-positiven Fluoreszenz, die also sowohl Annexin-V-FITC- als auch PI-positiv waren, wurden gemäß Herstellerangaben als nekrotisch interpretiert.

4.7 Phagozytostest

4.7.1 Isolierung der mononukleären Leukozyten aus peripher entnommenen Blutproben (PBMC)

Das zur Gewinnung von Makrophagen (Mø) genutzte Blut stammte von Milchkühen aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der JLU Gießen. Die im Ergebnisteil dargestellten Versuchsergebnisse wurden mit Zellen aus dem Blut von einer Kuh der Rasse Deutsch-Holstein Rotbunt (OM-Nr. DE 05 80350271, Geb.-Datum 21.07.2006) generiert. Die Kühe waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme in Laktation, vorberichtlich unauffällig und zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Das Blut wurde nach Stauung der *Vena jugularis* mittels einer Staukette unter sterilen Bedingungen entnommen. Zur Punktion der Vene wurde eine sterile Straußkanüle zur einmaligen Verwendung mit 1,8 mm Durchmesser (Fa. Medigro) verwendet. Die Kanüle wurde mittels eines Adapters mit einem Silikonschlauch verbunden, an dessen anderem Ende eine Stahlkanüle befestigt war. Diese wurde durch den Silikondeckel einer 500 ml Glasflasche (Fa. Schott), in der sich als Antikoagulans 80 ml Zitrat (3,8 %) befand, gestochen. Es wurden ca. 400 ml Blut unter ständigem Schwenken der Flasche aufgefangen. Zur Entlüftung der Flasche wurde eine weitere Kanüle durch den Silikondeckel der Flasche gestochen.

Nach der Entnahme wurde das Blut innerhalb von max. 30 min ins Labor verbracht. Dort wurden unter einer Sterilbank jeweils 40 ml Blut in ein steriles 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt. Es folgte eine Zentrifugation (Kühlzentrifuge 4K15C, Rotor 11350, Fa. Sigma) mit $2.380 \times g$ für 20 min bei Raumtemperatur (ungebremster Auslauf).

Im Anschluss wurde ca. ein Drittel des Plasmas verworfen und der *Buffy coat* mittels 5 ml Glaspipette entnommen. Dabei wurde pro 50 ml-Röhrchen ein Volumen von ca. 2 bis maximal 5 ml gewonnen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Der *Buffy coat* von jeweils 2 Röhrchen wurde so in einem Röhrchen vereinigt. Anschließend wurde mit PBS/EDTA auf 45 ml aufgefüllt und zentrifugiert ($800 \times g$, RT, ungebremster Auslauf). Zum Waschen wurde der Überstand bis zur 10 ml-Markierung vorsichtig abgenommen, der verbliebene Rest resuspendiert und das Röhrchen wieder bis 45 ml mit PBS/EDTA aufgefüllt und erneut zentrifugiert ($800 \times g$, RT, ungebremster Auslauf). Insgesamt wurde dieser Waschschrift dreimal durchgeführt.

Nach dem letzten Waschschrift wurde wiederum vorsichtig der Überstand bis zur 10 ml-Markierung entfernt, das Pellet resuspendiert, mit Erythrozytenlysepuffer auf 45 ml aufgefüllt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation mit 300 x g, bei 4 °C für 10 min mit Bremse. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 45 ml PBS/EDTA resuspendiert und wiederum zentrifugiert (300 x g; 4 °C; 10 min). Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach wurde das Pellet in 25 ml PBS/EDTA resuspendiert und mittels einer Glaspipette vorsichtig auf 20 ml Ficoll Histopaque® (Fa. GE Healthcare) aufgeschichtet. Die anschließende Zentrifugation wurde bei Raumtemperatur mit 800 x g für 45 min ohne Bremse durchgeführt.

Anschließend wurde ca. ein Drittel des Überstandes entfernt und die Interphase, in der sich die mononukleären Zellen angereichert hatten, vorsichtig entnommen und in ein neues 50 ml Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt. Jedes Röhrchen wurde mit PBS-Puffer auf 45 ml aufgefüllt und bei 600 x g, 4 °C für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets aus 2 Röhrchen zusammen in 10 ml PBS resuspendiert und das Volumen dieser Suspension mit PBS auf 45 ml aufgefüllt. Die nachfolgende Zentrifugation wurde mit 300 x g bei 4 °C für 10 min durchgeführt. Wiederum wurde der Überstand dekantiert und die Pellets aus 2 Röhrchen zusammen in 5 ml PBS resuspendiert und das Volumen dieser Suspension mit PBS auf 20 ml aufgefüllt. Zentrifugiert wurde abermals mit 300 x g bei 4 °C für 10 min. Nach dem Dekantieren aller Überstände wurden alle Pellets in 10 ml PBS vereinigt und ein Aliquot für die Zellzählung entnommen. Während dem letzten Zentrifugationsschritt (300 x g, 4 °C, 10 min) wurde eine Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer in der Verdünnung 1:20 in Trypanblau durchgeführt.

4.7.2 Generierung von Mø-Kulturen

Nach der Isolierung aus dem Blut wurden die PBMC zunächst in 1 ml Anzuchtmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde dann auf 4×10^6 /ml eingestellt und je 25 ml dieser Zellsuspension mit einer 30 ml-Spritze in einen Teflonbeutel (VueLife® Zellkulturbeutel, Fa. Südlaborbedarf) gefüllt. Somit enthielt jeder Beutel 1×10^8 Zellen in 25 ml Anzuchtmedium. Im Anschluss wurden die Beutel verschlossen, mit 75 %-igem Ethanol eingesprüht, abgewischt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 Vol.% CO₂ für 7 Tage inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Beutel aus dem Brutschrank entnommen und für 20 min bei 4 °C aufbewahrt, um die Zellen von der Beutelwand zu lösen. Anschließend wurden die Beutel unter der Sterilbank vorsichtig

von beiden Seiten beklopft und mit einer 60 ml-Spritze die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt. Dann wurden die Beutel zweimal mit gekühltem PBS-Puffer gespült und die Spüllüssigkeit in das Röhrchen zugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und anschließender Zentrifugation (300 x g, Raumtemperatur, 10 min, Bremsstufe 9) wurden alle Pellets vereinigt und in 1 ml Mø-Kultivierungsmedium resuspendiert.

Nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer, wobei nur große, granulierten Zellen gezählt wurden, erfolgte die Aussaat von ca. 2×10^6 der großen granulierten Zellen in 4 ml Mø-Kultivierungsmedium in sterilen 60 mm²-Plastikpetrischalen (Fa. Greiner Bio-One), gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C und 5 Vol.% CO₂ über Nacht (18 h). Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die Adhärenz der Makrophagen am Gefäßboden mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde der lymphozytenhaltige Überstand abgenommen und verworfen. Um die angehefteten Makrophagen abzulösen, wurden die Petrischalen mit je 3 ml 0,89 %-iger NaCl-Lösung gespült, mit 3 ml Accutase® (Fa. PAA Laboratories) beschickt und inkubiert (20 min, 37 °C, 5 Vol.% CO₂). Nach mikroskopischer Kontrolle auf Ablösung der Zellen, erkennbar an ihrer deutlichen Abrundung, wurden alle Überstände in ein 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt. Alle Petrischalen wurden mit je 3 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung gespült und die Spüllösung wurde ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation mit 202 x g bei 20 °C für 7 min. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Mø-Kultivierungsmedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 20 µl für die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer entnommen. Anhand des Ergebnisses der Zellzählung wurde die für die weiteren Versuche benötigte Makrophagen-Zellzahl eingestellt.

4.7.3 Identifizierung von Makrophagen anhand spezifischer Oberflächenantigene

Um zu sichern, dass es sich bei den isolierten und kultivierten Zellen wirklich um Makrophagen handelt, wurden sie mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit spezifischer Oberflächenantigene geprüft. Die Prüfung erfolgte jeweils im Doppelansatz, dessen Messwerte später gemittelt wurden. Zur Durchführung des Tests wurden die fraglichen Zellen nach der „Ernte“ aus den 60 mm²-Plastikpetrischalen (Fa. Greiner Bio-One) (siehe Generierung von Mø-Kulturen) verwendet. Es wurden 2×10^5 Makrophagen in Mø-Kultivierungsmedium pro Vertiefung in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (V-Form) eingesetzt und bei 400 x g für 4 min bei 4 °C zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 50 µl Primär-Antikörperlösung mit Maus-anti-Rind-CD14 pro Vertiefung (Gebrauchsverdünnung siehe **Tabelle 3**, verdünnt in Mø-Kultivierungsmedium), wurde die Platte für 30 min auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit Medium gewaschen (400 x g, 4 min, 4 °C). Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus-IgG₁-APC (Gebrauchsverdünnung siehe **Tabelle 3**) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf Eis. Nach Zentrifugation, Waschschrift und erneuter Zentrifugation wurden die Zellpellets jeweils in 50 µl PBS resuspendiert und in FACS-Teströhrchen, in die bereits jeweils 150 µl PBS vorgelegt worden waren, überführt und der Messung am FACSCalibur™-Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson) zugeführt.

4.7.4 Testansatz

Als Zielzellen für die Phagozytose durch die Makrophagen wurden BL-3-Zellen verwendet. Diese wurden zuvor mit dem Lebendfarbstoff CFSE (5-,6-Carboxy-fluorescein-diacetat-succinimidylester, Fa. Enzo Life Sciences) in einer Endkonzentration von 5 µM angefärbt. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs wurden alle Arbeitsschritte möglichst ohne Lichteinstrahlung durchgeführt (abgedunkelter Raum, das Licht der Sicherheitswerkbank wurde ausgeschaltet, Lagerung des Farbstoffs und Inkubation der Testansätze bei Dunkelheit). Die BL-3-Zellen wurden im Verhältnis 2:1 zu der Anzahl Makrophagen verwendet.

Färbung der Zielzellen

Die BL-3-Zellen wurden in BL-3-Medium suspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde ein 10 ml-Aliquot in eine Petrischale (92 x 16 mm, Fa. Nerbe Plus) pipettiert und mit 10 µl CFSE (Konzentration der Stammlösung 2,8 µg/ml, 5 mM) durch Schwenken durchmischt und inkubiert (5 Vol.% CO₂, 30 min). Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Petrischale mit 5 ml BL-3-Medium gespült. Die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls in das Röhrchen gegeben und dieses dann zentrifugiert (202 x g, RT, 7 min). Das entstandene Zellpellet wurde in BL-3-Medium resuspendiert, in Volumina à 8 ml auf mehrere Petrischalen entsprechend der Gesamtzellzahl aufgeteilt und inkubiert (37 °C, 5 Vol.% CO₂, 18 h). Am folgenden Tag wurden die BL-3-Suspensionen aus den Schalen in einem 50 ml-Röhrchen wieder zusammengeführt. Nach Zentrifugation (202 x g, 20 °C, 7 min) wurde das Pellet in 2 ml BL-3-Medium resuspendiert und eine Zellzählung durchgeführt.

Inkubation der Zielzellen mit den Serumproben

Zur Koinkubation mit den Serumproben wurden die in BL-3-Medium suspendierten BL-3-Zellen (4×10^5 Zellen pro Vertiefung) in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt, mit den fraglichen Serumproben (Endkonzentration im Testansatz entsprach der Serumverdünnung 1:10) vermischt und für 45 min bei 37 °C und 5 Vol.% CO₂ inkubiert.

Inkubation der Zielzellen mit den Makrophagen

In die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Flachboden) wurden jeweils 2×10^5 in Mø-Kultivierungsmedium suspendierte Makrophagen vorgelegt und bei 37 °C inkubiert, bis die Inkubation der BL-3-Zellen mit den Serumproben abgeschlossen war und die Zielzellen somit vorbereitet waren. Die vorbereiteten BL-3-Zellsuspensionen wurden dann zu den vorgelegten Makrophagen hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 Vol.% CO₂ für 4 h oder 18 h.

Durchflusszytometrische Analyse

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde aus jeder Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte ein 150 µl-Aliquot des Inhalts/Überstands abgenommen und in die Vertiefungen einer „DFZM-Platte“ (96-Loch-Mikrotiterplatte; V-Form; Fa. Greiner Bio-One) überführt. Diese DFZM-Platte wurde bei 400 x g für 4 min bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde der restliche Inhalt der Phagozytoseansätze in die DFZM-Platte überführt. Um die in der Zellkulturplatte verbliebenen, angehefteten Makrophagen abzulösen, wurden sie mit Accutase inkubiert (100 µl/Vertiefung; 37 °C, 5 Vol.% CO₂, 30 min). Gegen Ende der Inkubationszeit wurde die DFZM-Platte bei 400 x g für 4 min bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die abgelösten Makrophagen in der Accutase-Lösung gut resuspendiert und zu den entsprechenden Vertiefungen der DFZM-Platte hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellpellets jeweils in 50 µl PBS resuspendiert und in DFZM-Teströhrchen, in die bereits jeweils 150 µl PBS vorgelegt worden waren, überführt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

4.7.5 Auswertung

Alle Testansätze wurden im FACSCalibur™-Gerät (Fa. Becton Dickinson) analysiert. Zur Analyse wurde das gerätespezifische EDV-Programm „Cell Quest Pro“

verwendet, zur Auswertung der Daten das Programm FCS Express (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Ontario, Kanada).

Zuerst wurden die Zellpopulationen der Makrophagen und BL-3-Zellen anhand ihrer unterschiedlichen Seitwärtslichtstreuung (Maß für die Zellgranularität) und Vorwärtslichtstreuung (Maß für die Zellgröße) getrennt dargestellt. Für die Makrophagen wurde das elektronische Auswertfenster R1 eingerichtet. Die kleineren BL-3-Zellen befanden sich im Auswertfenster R2 (**Abbildung 6A**). Vom Durchflusszytometer wurden je Probe so viele Partikel vermessen, bis 15.000 Ereignisse im Makrophagen-Auswertfenster R1 gezählt worden waren.

In weiteren Schritten wurde die Zellpopulation im Auswertfenster R1 (Makrophagen) auf die Anzahl an CFSE-positiven Ereignissen hin ausgewertet (**Abbildung 6A**). Während der Phagozytose nehmen die ungefärbten Makrophagen die CFSE-positiven BL-3-Zellen auf und sind dann selbst CFSE-positiv, weshalb es zu einer Zunahme an CFSE-positiven Ereignissen in R1 kommen sollte.

Die Zellpopulation im Auswertfenster R2 für BL-3-Zellen wurde ebenfalls bezüglich der Anzahl an CFSE-positiven Ereignissen ausgewertet (**Abbildung 6B**). Bei erfolgter Phagozytose der BL-3-Zellen durch die Makrophagen sollte die Anzahl an CFSE-positiven Ereignissen in R2 abnehmen.

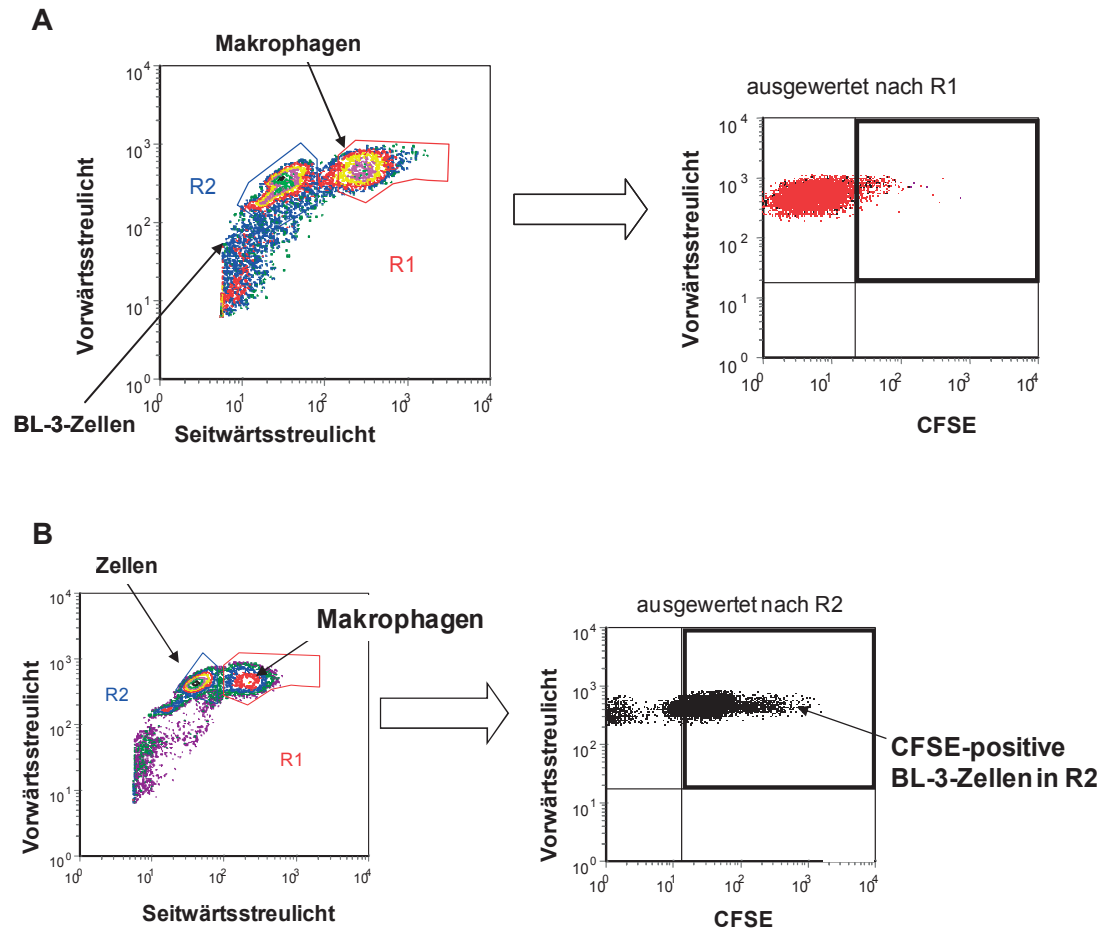


Abbildung 6: Auswert- und Analysestrategie bei der Auswertung des Phagozytose-Tests

Für die Makrophagen und BL-3-Zellen wurden im ersten Schritt anhand ihrer unterschiedlichen Vorwärts (FSC)- und Seitwärtstreulicht (SSC)-Werte spezifische elektronische Auswertfenster eingerichtet. Für die Makrophagen wurde das Auswertfenster R1 und für die kleineren BL-3-Zellen das Fenster R2 erstellt.

- A** Im zweiten Schritt wurde in der Zellpopulation von R1 der Anteil der CFSE-positiven Zellen ermittelt. Wenn die ungefärbten Makrophagen die CFSE-positiven BL-3-Zellen durch Phagozytose aufnehmen, werden sie selbst CFSE-positiv, weshalb die Anzahl an CFSE-positiven Zellen in R1 zunehmen sollte.
- B** In der Zellpopulation im Auswertfenster R2 wurde ebenfalls der Anteil an CFSE-positiven Zellen bestimmt. Bei Phagozytose der BL-3-Zellen durch die Makrophagen sollte die Anzahl an CFSE-positiven Zellen in R2 abnehmen.

5 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm „SPSS for Windows“ (Version 9.0, Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Die berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) galten bei $p \leq 0,05$ als signifikant. Die Signifikanzen wurden wie folgt kodiert und interpretiert:

$p > 0,05$:	n.s.	= nicht signifikant; wird nicht dargestellt
$0,01 < p \leq 0,05$:	*	= schwach signifikant;
$0,001 < p \leq 0,01$:	**	= signifikant;
$p \leq 0,001$:	***	= hoch signifikant.

Für die ermittelten Messwerte wurden gruppenspezifisch die Kennwerte Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum ermittelt und grafisch in Form von Box-Whisker-Plots (Syn. Kastengrafik) dargestellt. Welche Kennwerte aus diesen Plots ablesbar sind, ist in der **Abbildung 7** dargestellt. Die Korrelationsgrafiken wurden mit dem Programm Microsoft Excel (Version 2010) erstellt.

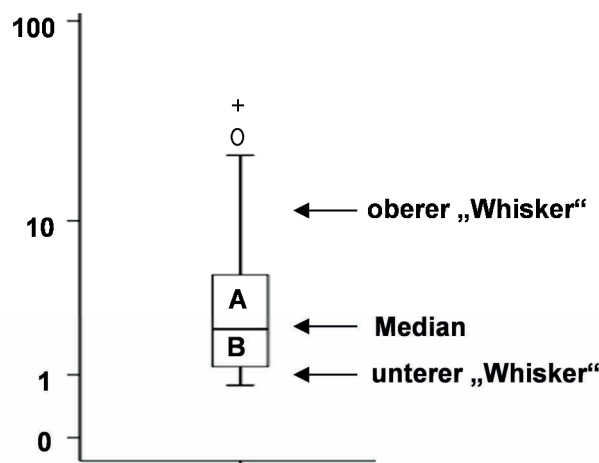


Abbildung 7: Ablesbare Kennwerte in den Box-Whisker-Plots.

Die Box spannt sich vom 25 %-Quartil bis zum 75 %-Quartil auf, in ihr ist der Median durch einen Querstrich markiert. Außerhalb der Boxen spannen sich nach oben und unten die Whiskers zum Minimum bzw. Maximum der Datenreihe. Extremwerte sind mit einem Kreis, Ausreißer mit einem Plus gekennzeichnet.

6 Verbrauchsmaterial und Lösungen

Das in dieser Arbeit verwendete Laborverbrauchsmaterial und die eingesetzten Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

IV Ergebnisse

1 Korrelation zwischen den mit DFZM-Allo-AK-Tests ermittelten Alloantikörpertitern

In der vorliegenden Arbeit wurden Allo-AK in den Serumproben von Rindern mit einem Serumlängsamagglutinationstest sowie mit neuartigen, auf der Durchflusszytometrie basierenden Bindungstests (Allo-AK-Tests) quantifiziert. In Fortentwicklung der von Bridger *et al.* (2011) publizierten Methodik wurden hierzu insgesamt 4 verschiedene DFZM-Allo-AK-Tests etabliert, die sich durch den als Testantigen verwendeten Zelltyp voneinander unterschieden. Dabei wurden mit dem sog. DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test bereits drei verschiedene Allo-AK-Titer ermittelt, je nachdem welche Leukozytenpopulation bei der Auswertung betrachtet wurde: DFZM-Allo-AK_{Lympho}-, DFZM-Allo-AK_{Mono}- und DFZM-Allo-AK_{Granulo}-Titer. In weiteren Varianten des Tests dienten Thrombozyten bzw. Zellen der Zelllinien BL-3 und MDBK als Testantigene (DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-, DFZM-Allo-AK_{BL-3}-, DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titer). In eigenen Versuchsreihen sollte zunächst der Frage nachgegangen, inwieweit die Allo-AK-Titer, die mit diesen verschiedenen bovinen Testantigenen ermittelt wurden, miteinander korrelieren.

1.1 Korrelation bei Verwendung von Leukozyten aus verschiedenen Spenderkälbern

Die Leukozyten und Thrombozyten mussten zur Verwendung als Testantigene immer wieder frisch aus Blutproben von Spenderkälbern isoliert und aufbereitet werden. Dabei wurden für eine Testreihe nur die Zellen eines einzigen Kalbes verwendet. Aus Gründen des Tierschutzes und des Alterns der Kälber kamen in unterschiedlichen Testreihen aber auch Zellen verschiedener Spenderkälber zum Einsatz. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Herkunft der Zellen einen prinzipiellen Einfluss auf die ermittelten Allo-AK-Titer hatte.

Um dies zu prüfen, wurden Leukozyten aus Blutproben von zwei verschiedenen Spenderkälbern (Spenderkälber 2 und 3) gewonnen und als Testzellen verwendet (**Tabelle 2**). Beide Spenderkälber stammten aus einem Betrieb, der keine Impfung gegen BVDV durchgeführt hatte und nach BVDV-Verordnung als BVDV-unverdächtig galt. Mit den isolierten Leukozyten beider Kälber wurde dann parallel mittels DFZM-

Allo-AK_{Leuko}-Test versucht, in 166 Serumproben Allo-AK nachzuweisen. Die hierzu verwendeten Serumproben stammten von weiblichen Rindern in den beiden Pregsure® BVD-Impfbetrieben (**Tabelle 1**), da es nur in diesen Betrieben Rinder mit höheren Allo-AK-Titern gab. In der vergleichenden Analyse wurden die mit Zellen von Kalb 2 gemessenen Titer mit den an Kalb 3 gemessenen Titern korreliert, wobei die Korrelation getrennt nach Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten vorgenommen wurde.

Wie aus der **Abbildung 8** ersichtlich ist, korrelierten am besten die mit den Lymphozyten ermittelten Allo-AK-Titer ($r = 0,92$). Auch mit den Monozyten der beiden Spenderkälber konnten gut reproduzierbare Allo-AK-Titer gemessen werden, der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,86$. Zwischen den mit Granulozyten gemessenen Allo-AK-Titern bestand mit $r = 0,67$ die geringste Übereinstimmung.

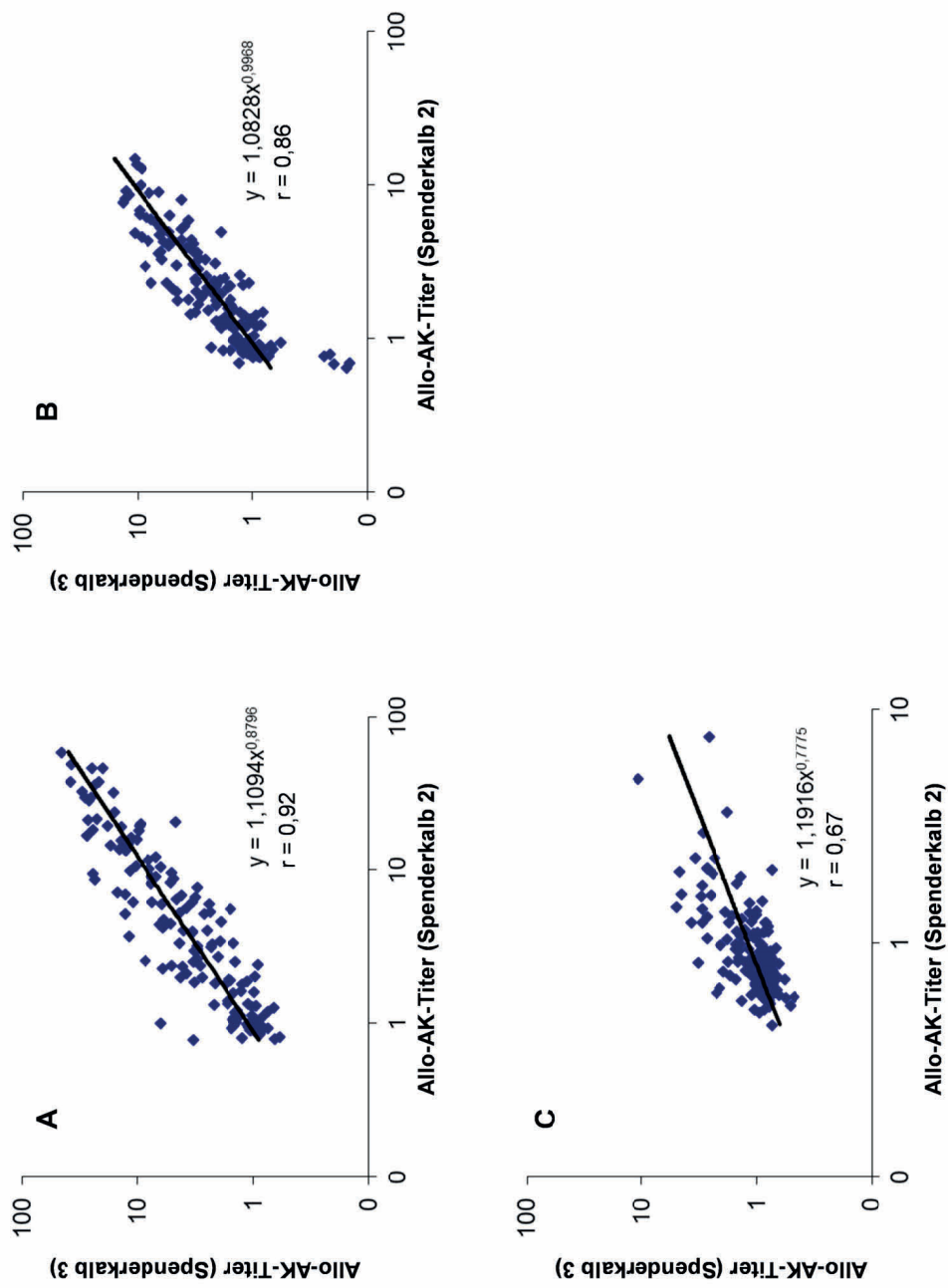


Abbildung 8: Korrelation zwischen den Allo-AK-Titern, die mit Leukozyten von 2 verschiedenen Spenderkälbern ermittelt wurden (Spenderkälber 2 und 3).
 Ergebnisse des DFZM-Allo-AK-Tests. Die Allo-AK-Titer wurden jeweils separat für Lymphozyten [A], Monozyten [B] und Granulozyten [C] bestimmt.

1.1.1 Korrelation bei Verwendung von Leukozyten sowie BL-3- und MDBK-Zellen

In einer weiteren Testreihe wurde der Frage nachgegangen, ob mit Zellen der bovinen Zelllinien BL-3 und MDBK im DFZM-Allo-AK-Test ebenfalls Allo-AK nachgewiesen werden können und ob die mit diesen Testantigenen ermittelten Titer mit denen korrelieren, die mit Leukozyten aus dem peripheren Blut gemessen werden. Für diese Untersuchung wurden abermals die 166 Serumproben von Rindern in den beiden Pregsure® BVD-Impfbetrieben (**Tabelle 1**) verwendet. Die Leukozyten und Thrombozyten stammten hierbei aus Blutproben von Spenderkalb 3.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind in der **Tabelle 4** zusammengefasst. Vor allem die mit Lymphozyten und Monozyten ermittelten Allo-AK-Titer korrelierten sehr stark miteinander ($r = 0,95$). Aber auch zwischen den anderen Blutzellen (Leukozyten, Thrombozyten) bestanden starke Korrelationen mit Koeffizienten zwischen 0,78 und 0,88.

Die mit den BL-3- und MDBK-Zellen ermittelten Allo-AK-Titer korrelierten in hohem Maße miteinander ($r = 0,91$) und sie stimmten etwas schwächer, aber immer noch gut mit den an Lymphozyten gemessenen Allo-AK-Titern überein (BL-3-Zellen, $r = 0,82$; MDBK-Zellen, $r = 0,83$).

Tabelle 4: Korrelationskoeffizienten für den Vergleich von Allo-AK-Titern, die mit verschiedenen Testzellen ermittelt wurden

(Ergebnisse des DFZM-Allo-AK-Tests)

Verwendete Testzellen	Korrelationskoeffizient					
	Lymphozyten*	Granulozyten*	Monozyten*	Thrombozyten*	BL-3-Zellen	MDBK-Zellen
Lymphozyten*	■	0,84	0,95	0,88	0,82	0,83
Granulozyten*	0,84	■	0,81	0,78	0,70	0,70
Monozyten*	0,95	0,86	■	0,82	0,81	0,80
Thrombozyten*	0,88	0,81	0,82	■	0,76	0,76
BL-3- Zellen	0,82	0,70	0,81	0,76	■	0,91
MDBK- Zellen	0,83	0,70	0,80	0,76	0,91	■

* Testzellen isoliert von Spenderkalb 3

Die Beurteilung der Korrelationskoeffizienten wurde nach folgender Einteilung vorgenommen:

Sehr gute bis gute Korrelation: 1,0 bis 0,75

mittlere Korrelation: 0,75 bis 0,5

schlechte bis keine Korrelation: 0,5 bis 0

1.2 Gegenüberstellung der im Serumlangsammagglutinationstest und im DFZM-Allo-AK-Test erzielten Titer

Der in dieser Arbeit verwendete Serumlangsammagglutinationstest (SLA-Test) wurde entwickelt, nachdem in den Vorversuchen zur Etablierung des MTT-Tests ein interessantes Phänomen beobachtet worden war. So zeigte sich bei der Inkubation von BL-3-Zellen mit Serumproben bei 37 °C für 24 h, dass Allo-AK-positive Seren die BL-3-Zellen verklumpten, was zur Bildung von sowohl mikro- als auch makroskopisch sichtbaren Agglutinaten führte. Dieses Phänomen ließ sich mit weiteren Serumproben reproduzieren und führte schließlich zur Etablierung des sogenannten Serumlangsammagglutinationstests (SLA-Test).

Zur Evaluierung des SLA-Tests wurden die Agglutinationstiter von 86 Serumproben aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben mit den entsprechenden DFZM-Allo-AK-Titern verglichen (**Tabelle 5**). Die im SLA-Test bestimmten Titer korrelierten am stärksten mit den DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Titern ($r = 0,89$) und den DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titern ($r = 0,84$). Gute Übereinstimmung bestand auch mit den DFZM-Allo-AK_{Lympho}-

und den DFZM-Allo-AK_{Mono}-Titern ($r = 0,81$ bzw. $r = 0,80$). Weniger gut korrelierten die SLA-Titer mit den Werten im DFZM-Allo-AK_{Granulo}-Test ($r = 0,60$) und im DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Test ($r = 0,68$).

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten für den Vergleich von Allo-AK-Titern, die mit verschiedenen Testzellen ermittelt wurden, und den SLA-Titern

Verwendete Testzellen	Korrelationskoeffizient						
	Lymphozyten*	Granulozyten*	Monozyten*	Thrombozyten*	BL-3-Zellen	MDBK-Zellen	SLA-Titer
SLA- Titer	0,81	0,60	0,80	0,68	0,89	0,84	■

*Testzellen isoliert von Spenderkalb 3

2 Vorkommen von Alloantikörpern bei Kühen mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus

2.1 Alloantikörper in Serumproben

2.1.1 Ergebnisse im DFZM-Allo-AK-Test

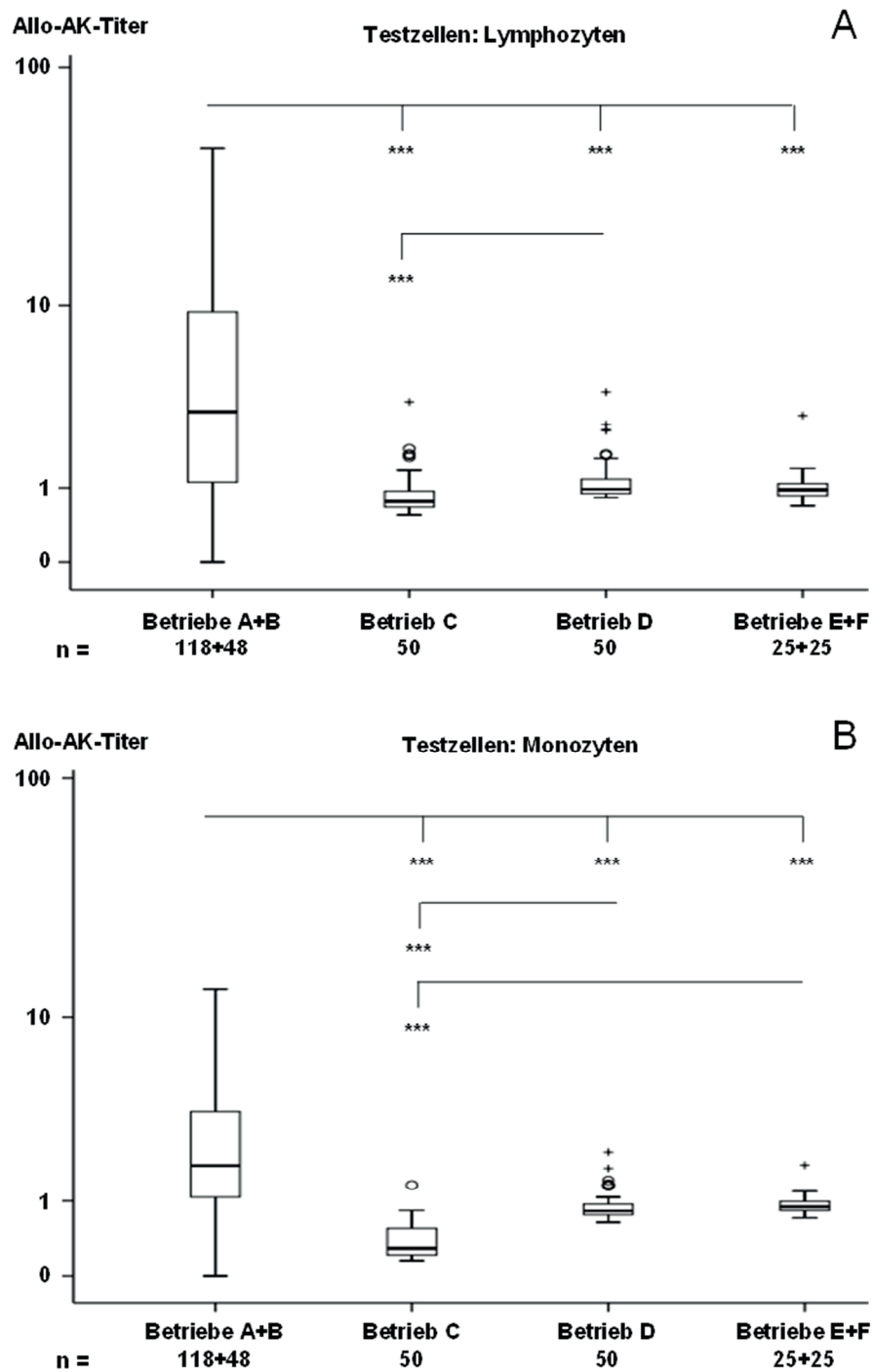
2.1.1.1 Vergleich von 6 Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus

Mit dem DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test und dem DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Test wurden 316 Serumproben aus 6 verschiedenen rinderhaltenden Betrieben (siehe **Tabelle 1**) auf Allo-AK untersucht. Um die Rolle des Impfstoffes PregSure® BVD zu beleuchten, unterschieden sich die Betriebe hinsichtlich des Einsatzes von BVDV-Impfstoffen voneinander („BVDV-Impfstatus“). Im DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test wurden die Titer getrennt nach Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten erfasst (**Abbildung 9 A-D**). Die Leukozyten und Thrombozyten für diese Testreihe stammten aus Blutproben von Spenderkalb 3.

Unabhängig von den betrachteten Testzellen waren die Allo-AK-Titer in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B im Mittel hoch signifikant höher als in dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C und im Bovidex®-Impfbetrieb D sowie den beiden Kontrollbetrieben E und F ($p \leq 0,001$, Nemenyi-Test für paarweisen Vergleich). Die höchsten Titer wurden beobachtet, wenn Lymphozyten als Testzellen dienten. Mit Lymphozyten bzw. Monozyten als Testzellen waren auch die Titer im Bovidex®-Impfbetrieb D durchschnittlich hoch signifikant höher als im Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C ($p \leq 0,001$). Auch in den DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Titern unterschieden sich die beiden PregSure® BVD-Impfbetriebe hoch signifikant ($p \leq 0,001$) von allen anderen Betrieben.

Neben Blutleukozyten und -thrombozyten wurden auch die BL-3- und MDBK-Zellen als Testzellen zur Allo-AK-Titer-Bestimmung verwendet. Mit beiden Zelllinien zeigten die Kühe aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben im Durchschnitt hoch signifikant ($p \leq 0,001$) bzw. signifikant ($p \leq 0,01$) höhere Allo-AK-Titer als die Kühe aus den anderen Betrieben (**Abbildung 10**). Die Bovidex®-geimpften Kühe (Betrieb D) wiesen im Vergleich zu den Bovilis® BVD-MD-geimpften Kühen (Betrieb C) und den

ungeimpften Kontrollkühen (Betriebe E und F) im Mittel hoch signifikant ($p \leq 0,001$) höhere DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titer auf.



(Fortsetzung der Abbildung und Erläuterungen siehe nächste Seite)

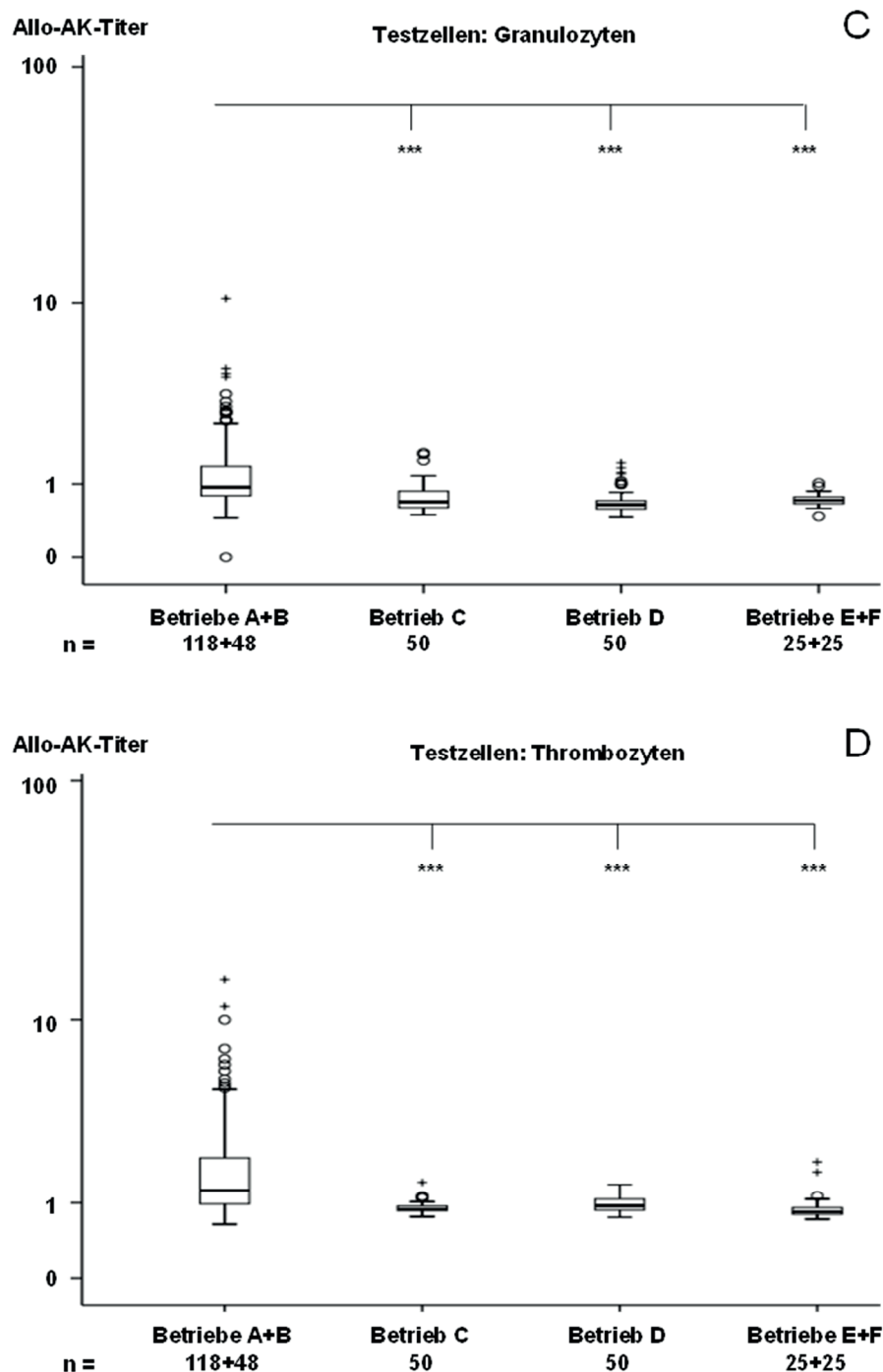


Abbildung 9: Alloantikörper in Serumproben von Kühen in 6 rinderhaltenden Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus

Ergebnisse der DFZM-Allo-AK-Tests in der Box-Whisker-Plot-Darstellung. Allo-AK-Titer wurden mit Leukozyten [Lymphozyten (A), Monozyten (B), Granulozyten (C)] und Thrombozyten [D] in Serumproben von Kühen aus 2 PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B, einem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C, einem Bovidec®-Impfbetrieb D und 2 Kontrollbetrieben E und F (BVDV-unverdächtig, ohne Impfung gegen BVDV) bestimmt.

Nemenyi-Test für paarweisen Vergleich: *** $p \leq 0,001$

O Extremwerte; + Ausreißer; n = Anzahl der Serumproben

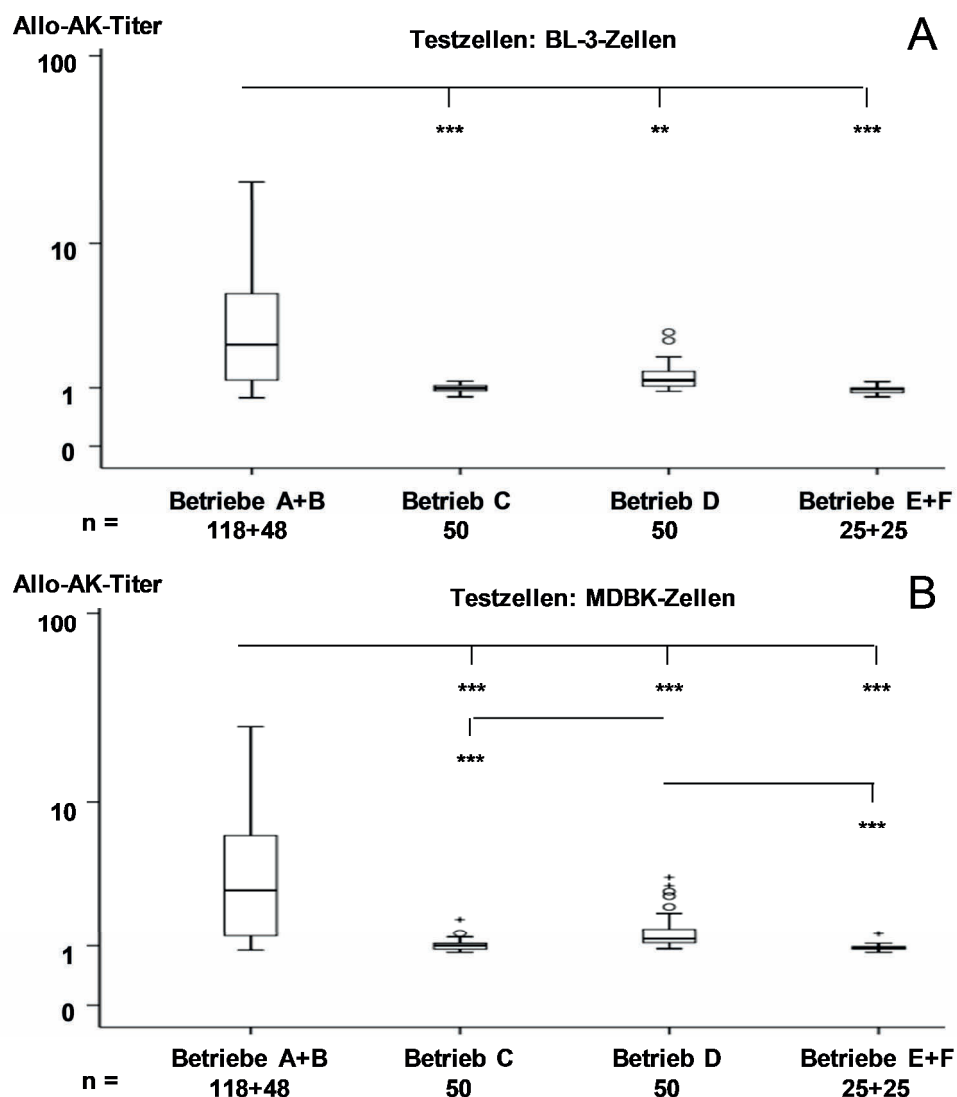


Abbildung 10: Alloantikörper in Serumproben von Kühen in 6 rinderhaltenden Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus.

Ergebnisse der DFZM-Allo-AK-Tests in der Box-Whisker-Plot-Darstellung. Allo-AK-Titer wurden mit BL-3-Zellen [A] und MDBK-Zellen [B] in Serumproben von Kühen aus 2 PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B, einem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C, einem Bovidec®-Impfbetrieb D und 2 Kontrollbetrieben E und F (BVDV-unverdächtig, ohne Impfung gegen BVDV) bestimmt.

Nemenyi-Test für paarweisen Vergleich: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$

O Extremwerte; + Ausreißer; n = Anzahl der Serumproben

2.1.1.2 **Alloantikörper bei PregSure® BVD-geimpften Kühen: Vergleich von BNP-Muttern und Nicht-BNP-Muttern**

Eine weitere Frage war, ob unter den mit PregSure® BVD-geimpften Kühen die BNP-Muttern höhere Konzentrationen an Allo-AK in ihrem Blut aufwiesen, als Kühe, die BNP-unverdächtig waren. Von den insgesamt 166 Kühen aus den PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B hatten 27 Kühe BNP-Kälber zur Welt gebracht. Davon befanden sich 24 BNP-Mütter in Betrieb A und 3 BNP-Mütter in Betrieb B. Für die Analyse wurden die mit den DFZM-Allo-AK-Tests ermittelten Titer dieser Kühe mit den Titern der anderen PregSure® BVD-geimpften Kühe im Alter von über 2 Jahren (n = 130) verglichen.

Die Untersuchung ergab, dass sich die Wertebereiche der BNP-Mütter und der Nicht-BNP-Mütter meist weit überlappten, die Allo-AK-Titer im Mittel bei den BNP-Müttern aber hoch signifikant ($p \leq 0,001$) höher waren als bei den Nicht-BNP-Müttern. Dieser signifikante Unterschied war unabhängig davon, ob Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten), Thrombozyten (**Abbildung 11**) oder BL-3- oder MDBK-Zellen (**Abbildung 12**) als Testantigen verwendet wurden.

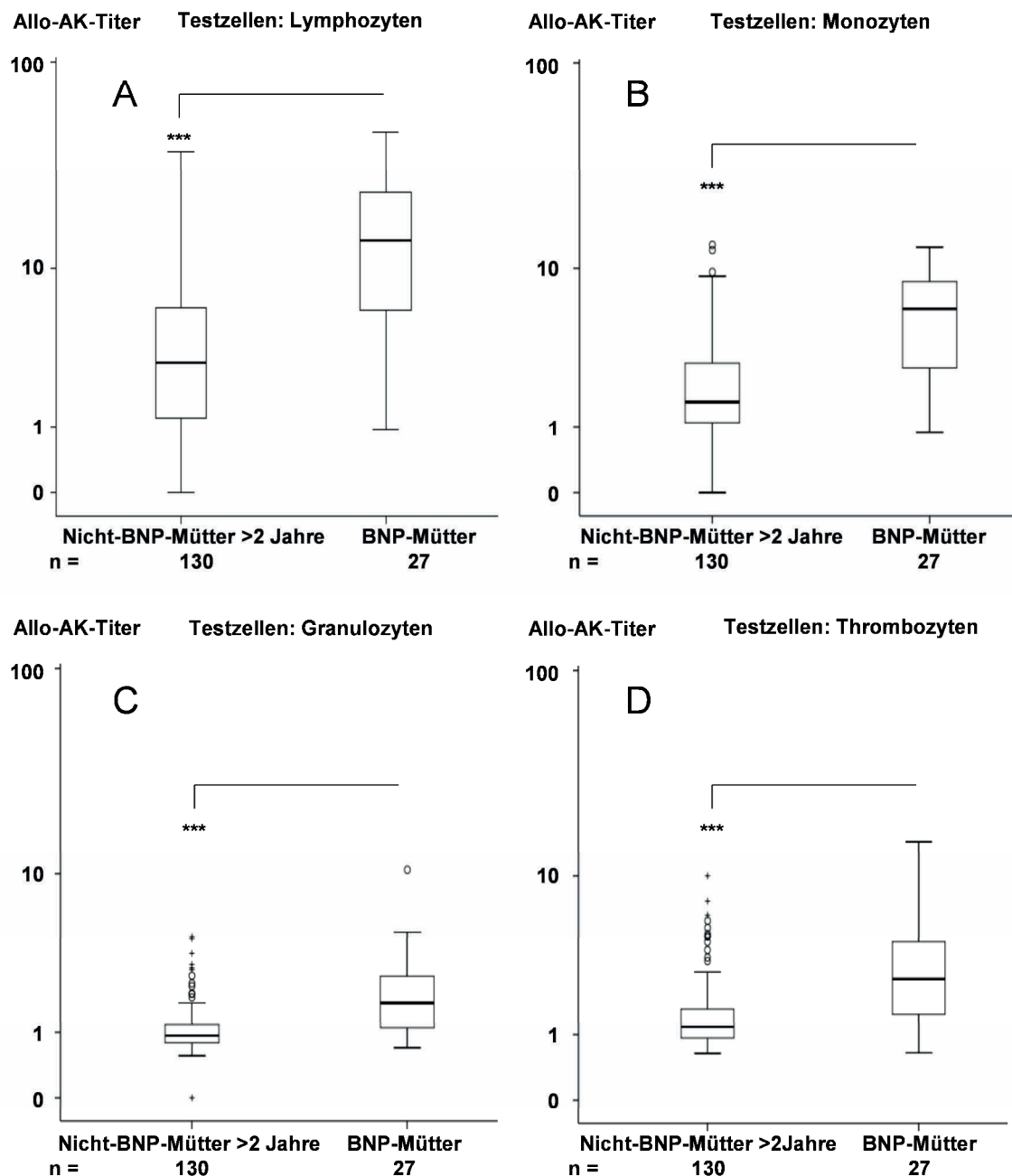


Abbildung 11: Allo-AK-Titer von BNP-Müttern und Nicht-BNP-Müttern in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B.

Ergebnisse der DFZM-Allo-AK-Tests in der Box-Whisker-Plot-Darstellung. Allo-AK-Titer wurden mit Lymphozyten [A], Monozyten [B], Granulozyten [C] und Thrombozyten [D] in Serumproben von Kühen bestimmt, die mindestens 1 BNP-Kalb geboren hatten (BNP-Mütter) und von anderen Kühen > 2 Jahre (Nicht-BNP-Mütter) in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben.

Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: *** $p \leq 0,001$

O Extremwerte; + Ausreißer; n = Anzahl der Serumproben

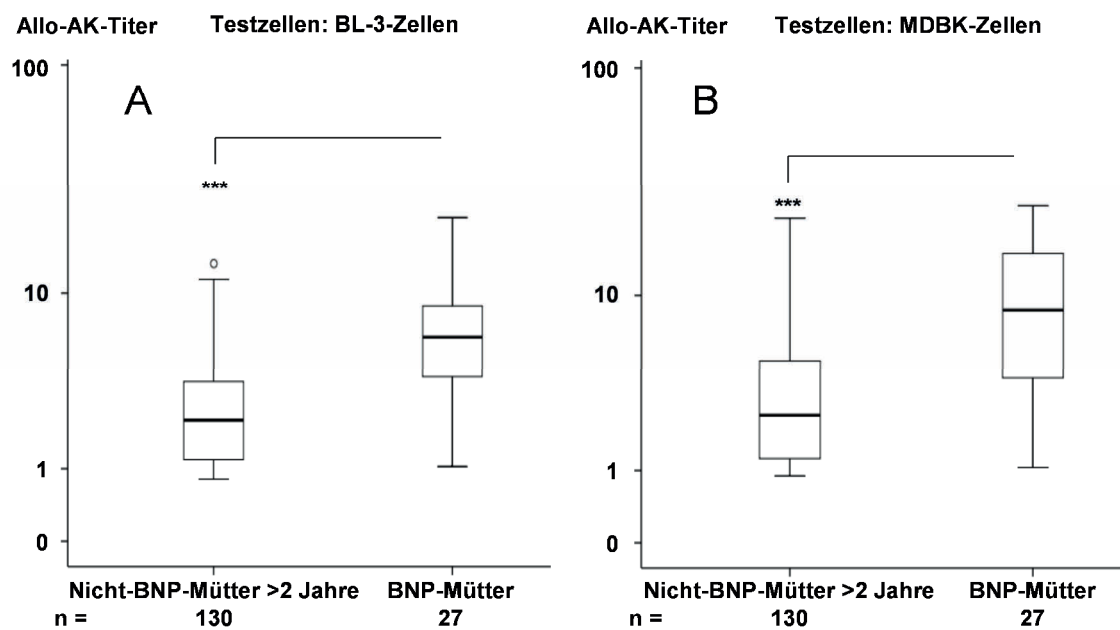


Abbildung 12: Allo-AK-Titer von BNP-Müttern und Nicht-BNP-Müttern in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B.

Ergebnisse der DFZM-Allo-AK-Tests in der Box-Whisker-Plot-Darstellung. Allo-AK-Titer wurden mit BL-3-Zellen [A] und MDBK-Zellen [B] in Serumproben von Kühen bestimmt, die mindestens 1 BNP-Kalb geboren hatten (BNP-Mütter) und in Serumproben von anderen Kühen > 2 Jahre (Nicht-BNP-Mütter) in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben.

Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: *** $p \leq 0,001$

O Extremwerte; + Ausreißer; n = Anzahl der Serumproben

2.1.1.3 Einfluss des Alters auf den Anteil Alloantikörper-positiver Tiere unter den Kühen in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben

Es wurde vermutet, dass die Höhe der Allo-AK-Titer mit dem Alter bzw. mit der Anzahl der PregSure® BVD-Impfungen zunimmt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die 165 Kühe, von welchen sich das Alter eindeutig ermitteln ließ, in den PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B in sechs Altersgruppen aufgeteilt. Um die ermittelten Allo-AK-Titer als negativ, fraglich und positiv einteilen zu können, wurden das 95 %-ige und das 99 %-ige Quantil der Titer aus den beiden Kontrollbetrieben E und F als Cut off-Werte definiert. Titerwerte \geq 99 %-ige Quantil wurden als positiv eingestuft.

Betrachtet man die DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titer, so ist in beiden Betrieben eine kontinuierliche Zunahme des Prozentsatzes seropositiver Kühe mit dem Alter erkennbar, die bei den Fünfjährigen bei 100 % kulminiert (**Abbildung 13**). In der Gruppe der Zweijährigen waren nur 10 % (Betrieb A) bzw. 22 % (Betrieb B) der Kühe Allo-AK-positiv. Bei weiblichen Rindern im Alter von unter 2 Jahren waren bei den 9 mit PregSure® BVD-geimpften Kühen in Betrieb B keine Allo-AK nachweisbar. Im Betrieb A gab es keine PregSure® BVD-Impflinge im Alter von weniger als 2 Jahren.

Anteil Allo-AK-positiver Rinder [%]

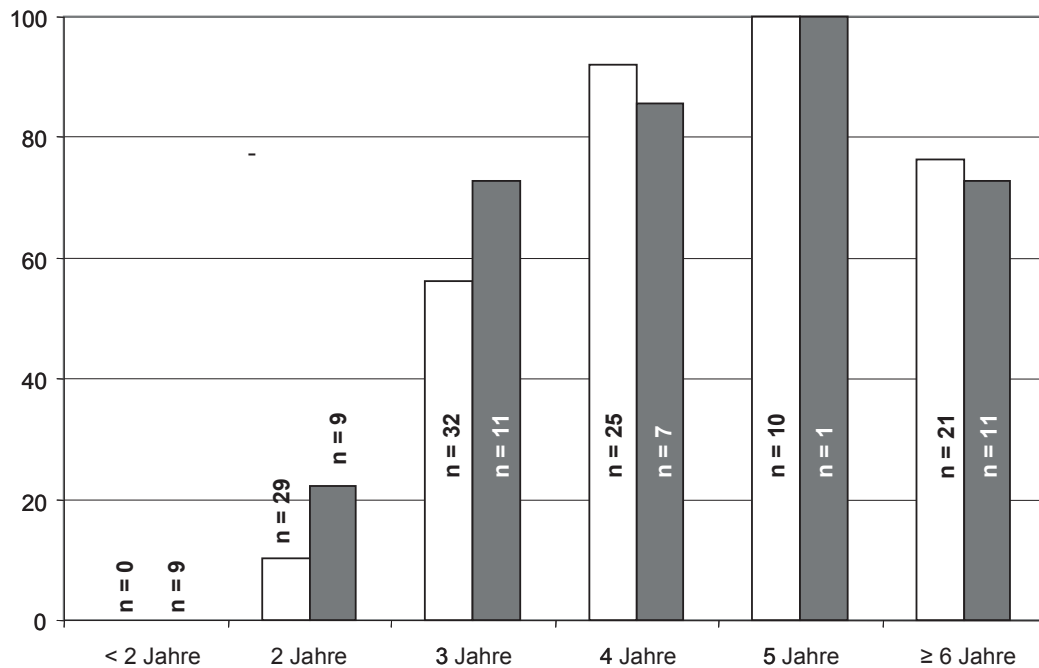


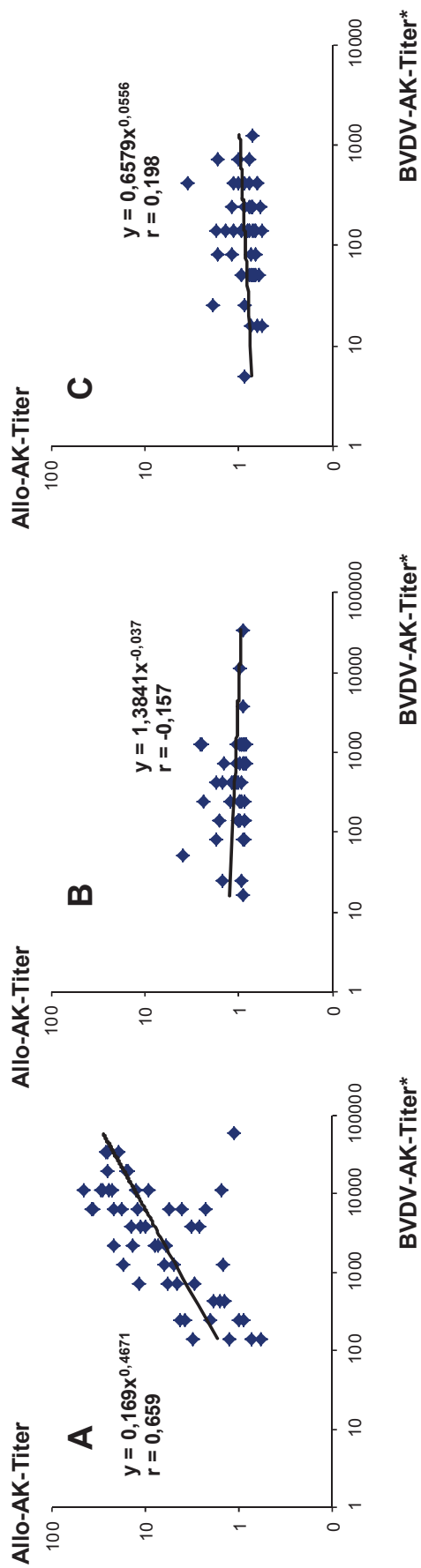
Abbildung 13: Anteil Allo-AK-positiver Kühe in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben in Abhängigkeit von der Altersgruppe.

Ergebnisse der DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Tests mit Leukozyten aus Spenderkalb 3. Die weißen Balken repräsentieren den PregSure® BVD-Impfbetrieb A (n = 117) und die grauen Balken den PregSure® BVD-Impfbetrieb B (n = 48). Um Allo-AK-Titer als negativ, fraglich und positiv einteilen zu können, wurden das 95 %-ige und das 99 %-ige Quantil der Titer aus den beiden Kontrollbetrieben E und F als Cut off-Werte definiert. Titerwerte ≥ 99 %-ige Quantil wurden als positiv angesehen.

2.1.1.4 Korrelation der Allo-AK-Titer mit BVDV-Impftitern

Um den Zusammenhang zwischen der Verabreichung von BVDV-Impfstoffen und dem Vorhandensein von Allo-AK im Blut der Rinder näher zu beleuchten, wurden in Kooperation mit dem Institut für Virologie der JLU Gießen, die BVDV-Antikörper-Titer in den Serumproben bestimmt und mit den DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titern korreliert. Zu dieser Analyse wurden eine Auswahl an Serumproben aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B (n = 53), sowie die Serumproben aus dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C (n = 50) und aus dem Bovidec®-Impfbetrieb D (n = 50) herangezogen. Die DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titer waren mit Leukozyten aus Spenderkalb 3 ermittelt worden. Das Ergebnis der Korrelationsanalysen ist in der **Abbildung 14** dargestellt.

In den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B korrelierten die BVDV-Impftiter und die DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titer moderat miteinander ($r = 0,659$). Dagegen waren die Korrelationskoeffizienten bei Kühen in dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C und in dem Bovidec®-Impfbetrieb D sehr niedrig ($r = 0,198$ bzw. $r = -0,157$).



*bestimmt als log ND₅₀

Abbildung 14: Korrelationen zwischen BVDV-Titern und DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titern bei Kühen in den 4 BVDV-Impfbetrieben.

Ergebnisse des BVDV-Neutralisationstests und des DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Tests mit Leukozyten aus Spenderkalb 3. In dieser Korrelationsanalyse wurden Antikörpertiter von Kühen aus den PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B [A] (n = 53), aus dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C [B] (n = 50) und Bovidoc®-Impfbetrieb D [C] (n = 50) betrachtet.

2.1.2 Ergebnisse im Serumlangsamagglutinationstest

Die DFZM-Allo-AK-Tests waren im Vergleich zu dem in dieser Studie ebenfalls etablierten Serumlangsamagglutinationstest (SLA-Test) methodisch aufwändig, teuer und erlaubten in gleicher Zeit nur einen kleineren Probendurchsatz. Aus diesem Grund wurde eine Auswahl von 161 Serumproben auch in dem SLA-Test mit BL-3-Zellen auf Allo-AK getestet. Zur systematischen Auswahl der Proben wurden alle Serumproben eines Betriebs nach ihrem DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Titer gereiht. Aus der dabei entstehenden Rangliste wurde dann jede zweite Probe ausgewählt.

Die Titer, die in den Serumproben aus Kühen in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben bestimmt wurden, waren im Durchschnitt hoch signifikant ($p \leq 0,001$) höher als die Titer der Bovilis® BVD-MD-geimpften Kühe und der Kontrollkühe (**Abbildung 15**). Auch im Vergleich mit den Bovidec®-geimpften Kühen waren die Titer-Kenndaten Maximum, 1. und 3. Quartil sowie Median bei den PregSure® BVD-geimpften Kühen deutlich höher. Der Unterschied zwischen diesen beiden Impfbetrieben war statistisch jedoch nicht zu sichern ($p > 0,05$). Die Titer der Kühe aus dem Bovidec®-Impfbetrieb D waren jedoch ebenfalls signifikant ($p \leq 0,01$) höher als diejenigen der Kühe aus dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C und den Kontrollbetrieben E und F.

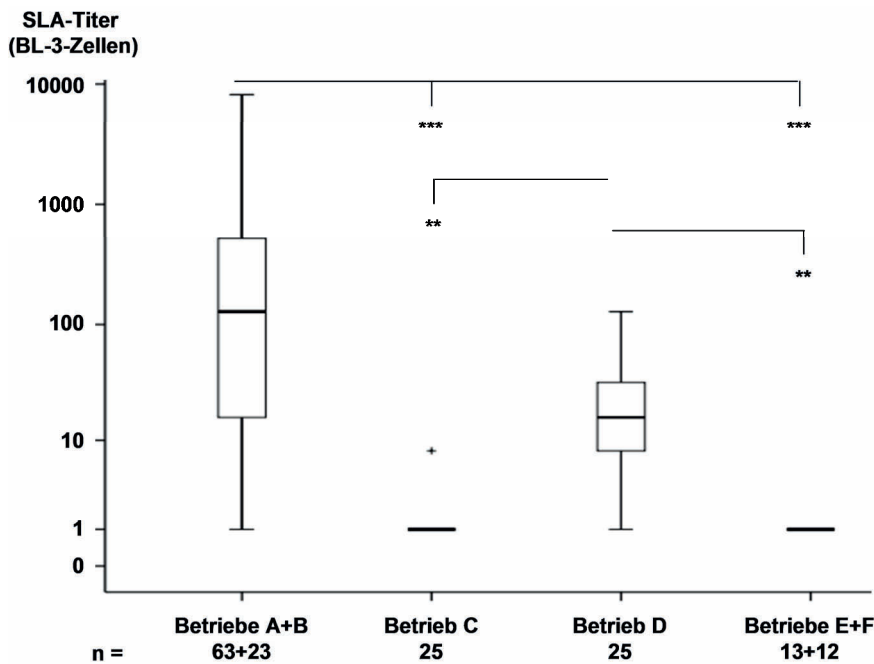


Abbildung 15: Alloantikörper in Serumproben von Kühen in 6 rinderhaltenden Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus.

Ergebnisse des Serumlangsamagglutinationstests in der Box-Whisker-Plot-Darstellung. Allo-AK-Titer wurden mit BL-3-Zellen bei Kühen aus 2 PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B, einem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C, einem Bovidec®-Impfbetrieb D und 2 Kontrollbetrieben E und F (BVDV-unverdächtig, ohne Impfung gegen BVDV) bestimmt.

Nemenyi-Test für paarweisen Vergleich: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$

+ Ausreißer; n = Anzahl der Serumproben

2.2 Alloantikörper in Kolostrumproben

Von 13 Kühen in dem PregSure® BVD-Impfbetrieb A und von 3 Kühen im Kontrollbetrieb E standen Kolostrumproben für serologische Untersuchungen zur Verfügung. Die Proben wurden mit dem DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test auf Allo-AK untersucht, und die dabei ermittelten Titer dann mit dem Allo-AK-Titer der von demselben Tier stammenden Serumprobe verglichen (**Abbildung 16**).

Mit Ausnahme einer einzigen Kuh wiesen alle getesteten Kühe höhere Allo-AK-Titer in der Kolostrumprobe auf als in der korrespondierenden Serumprobe. Bei den Kühen aus dem PregSure® BVD-Impfbetrieb A waren die mit MDBK-Zellen ermittelten Titer in den Kolostren im Mittel 1,35-mal so hoch wie die Titer in den Blutseren, der Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Vergleich zu den Kolostren der Kontrollkühe wiesen die Kolostren der PregSure® BVD-geimpften Kühe signifikant höhere Allo-AK-Titer auf ($p \leq 0,01$). Ein signifikanter Unterschied bestand auch

zwischen den Kolostren der BNP-Mütter und der Nicht-BNP-Mütter aus dem PregSure® Impfbetrieb A ($p = 0,042$) sowie zwischen deren Serum-Proben ($p = 0,013$).

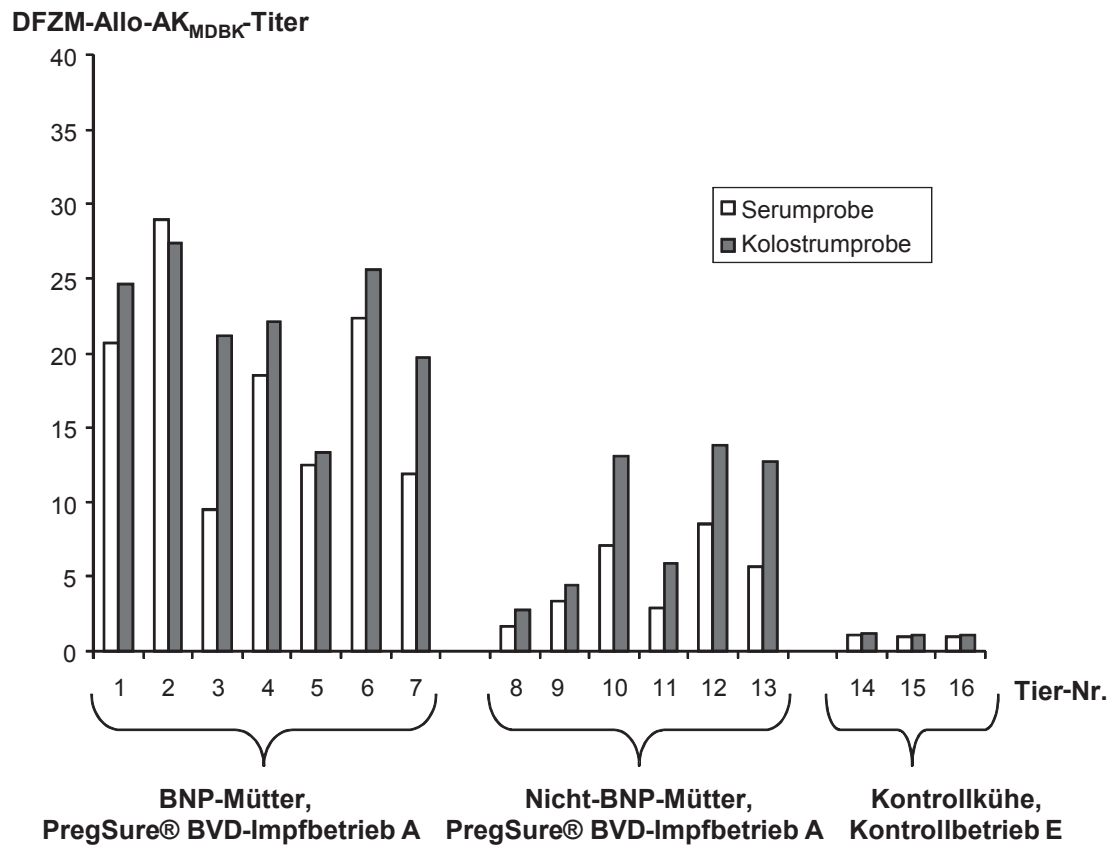


Abbildung 16: Allo-AK-Titer in korrespondierenden Serum- und Kolostrumproben aus PregSure® BVD-geimpften Kühen und Kontrollkühen.

Ergebnisse des DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Tests. Allo-AK-Titer wurden bei 13 Kühen im PregSure® BVD-Impfbetrieb A und bei 3 Kühen im Kontrollbetrieb E (BVDV-unverdächtig, ohne Impfung gegen BVDV) bestimmt.

3 **Eigenschaften der Alloantikörper in Rinderserumproben**

3.1 **Wirkung auf bovine Zielzellen *in vitro***

Bisher ist nicht bekannt, in welcher Weise die bei Rindern im Zusammenhang mit BNP nachgewiesenen Allo-AK auf die bovinen Zellen einwirken, nachdem sie an diese gebunden haben. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der hier präsentierten Arbeit geprüft, ob die Allo-AK auf die Zielzellen direkt oder mittels Komplement-vermittelter Zytolyse toxisch wirken und ob sie in diesen Apoptose oder Nekrose induzieren. In einer weiteren Untersuchung wurde der Hypothese nachgegangen, dass die Allo-AK opsonierend wirken und damit die Phagozytose der opsonierten Zellen durch körpereigene Makrophagen anstoßen.

3.1.1 **Zytotoxizität**

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde untersucht, ob die nachgewiesenen Allo-AK auf Zellen bovinen Ursprungs zytotoxisch wirken. Für diese Untersuchung wurden insgesamt 83 Serumproben verwendet. Davon stammten 27 Proben von BNP-Muttertieren, 29 von anderen PregSure® BVD-geimpften Kühen ohne BNP-Nachkommen und 27 Serumproben aus den Kontrollbetrieben E und F (ohne BVDV-Impfung, BVDV-unverdächtig). Die 29 Proben von den PregSure® BVD-geimpften Kühen ohne BNP-Nachkommen wurden wegen ihrer hohen Allo-AK-Titer im DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test ausgewählt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob Komplement für die möglicherweise zytotoxische Wirkung von Serumproben von Bedeutung ist. Dazu wurden 11 ausgewählte Serumproben jeweils in parallelen Ansätzen mit und ohne Zusatz von Meerschweinchenkomplement im Zytotoxizitätstest geprüft. Vergleicht man die Testansätze mit den Negativkontrollansätzen (Zellkulturmedium ohne Serumprobe), dann beeinträchtigten die Serumproben die Vitalität der MDBK-Zellen allenfalls geringfügig, wenn nicht auch Komplement zugesetzt worden war. Insbesondere bestand kein Unterschied zwischen den 6 Serumproben aus PregSure® BVD-geimpften Kühen und den Proben aus Kontrollkühen (**Abbildung 17B**). Erst bei Anwesenheit von Meerschweinchenkomplement wurde ein toxischer Effekt der Allo-AK-haltigen Serumproben aus PregSure® BVD-geimpften Kühen im Vergleich zu den Kontrollproben (keine BVDV-Impfung) deutlich (**Abbildung 17**). Der Unterschied zu

den Serumproben aus den Kontrolltieren war hoch signifikant ($p < 0,001$). Wegen dieser Resultate wurde in den folgenden Untersuchungen jedem Testansatz immer auch eine konstante Menge (Endkonzentration pro Testansatz 7 % (v/v)) an Meer-schweinchenkomplement zugesetzt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die zytotoxische Aktivität aller 83 Serumproben im Zytotoxizitätstest mittels Verdünnungsverfahren präziser quantifiziert. Dabei wurde die Aktivität mittels logit-log-Transformation in CD_{50}/ml ermittelt (**Abbildung 18**). Hohe CD_{50}/ml -Werte kamen bei den Seren von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern und auch bei PregSure® BVD-geimpften Nicht-BNP-Müttern vor. Zwischen diesen beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der zytotoxischen Aktivität. Dagegen war die zytotoxische Aktivität der Serumproben aus PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern schwach signifikant größer als die Aktivität der Serumproben aus Kontrollkühen ($p \leq 0,05$). Die Proben der PregSure® BVD-geimpften Nicht-BNP-Mütter unterschieden sich sogar signifikant von den Kontrollproben ($p \leq 0,01$).

Die zytotoxischen Aktivitäten der Serumproben aus den PregSure® BVD-Impfbetrieben (gemessen in CD_{50}/ml) wurden mit den entsprechenden Allo-AK-Titerwerten aus dem DFZM-Allo-AK_{MDBK}- und dem DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Test korreliert (**Abbildung 19**). Diese Korrelationsanalyse wurde getrennt für die Serumproben der Nicht-BNP-Mütter ($n = 29$) (**Abbildung 19 A und B**) und der BNP-Mütter ($n = 27$) durchgeführt (**Abbildung 19 C und D**). Zwischen der zytotoxischen Aktivität einer Serumprobe und ihrem Allo-AK_{MDBK}-Titer bestand sowohl bei den Nicht-BNP-Mütter als auch bei den BNP-Müttern eine moderate Korrelation ($r = 0,61$ bzw. $r = 0,70$). Bei den BNP-Mütter zeigte sich mit $r = 0,71$ eine ähnlich hohe Korrelation auch zwischen zytotoxischer Aktivität und Allo-AK_{Lympho}-Titer. Bei den Nicht-BNP-Müttern fiel diese Korrelation deutlich schwächer aus ($r = 0,31$).

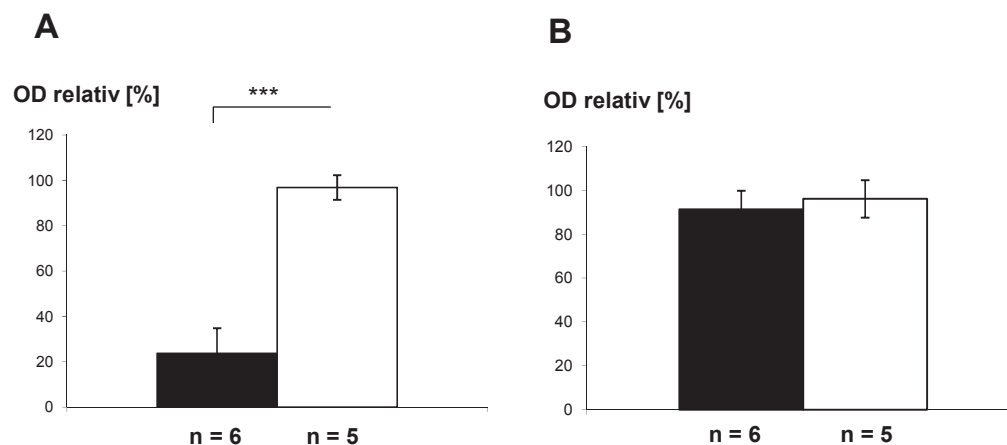


Abbildung 17: Vitalität von MDBK-Zellen nach Inkubation mit Rinderserumproben mit [A] und ohne [B] Komplementzusatz.

Ergebnisse von Rinderserumproben (n = 11) im Zytotoxizitätstest (MTT-Test). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen. Maß der zellulären Vitalität ist die Menge an Formazan, welches von vitalen Zellen aus MTT gebildet wird und photometrisch bestimmbar ist. Die Messwerte der Testansätze sind auf Messwerte von Negativkontrollansätzen normalisiert (serumprobenfrei, komplementfrei, entspricht 100 %).

schwarze Säulen = Allo-AK-haltige Serumproben aus PregSure® BVD-geimpften Kühen (n = 6).

weiße Säulen = Serumproben aus den Kontrollbetrieben E und F (n = 5; BVDV-unverdächtig, ohne Impfung gegen BVDV)

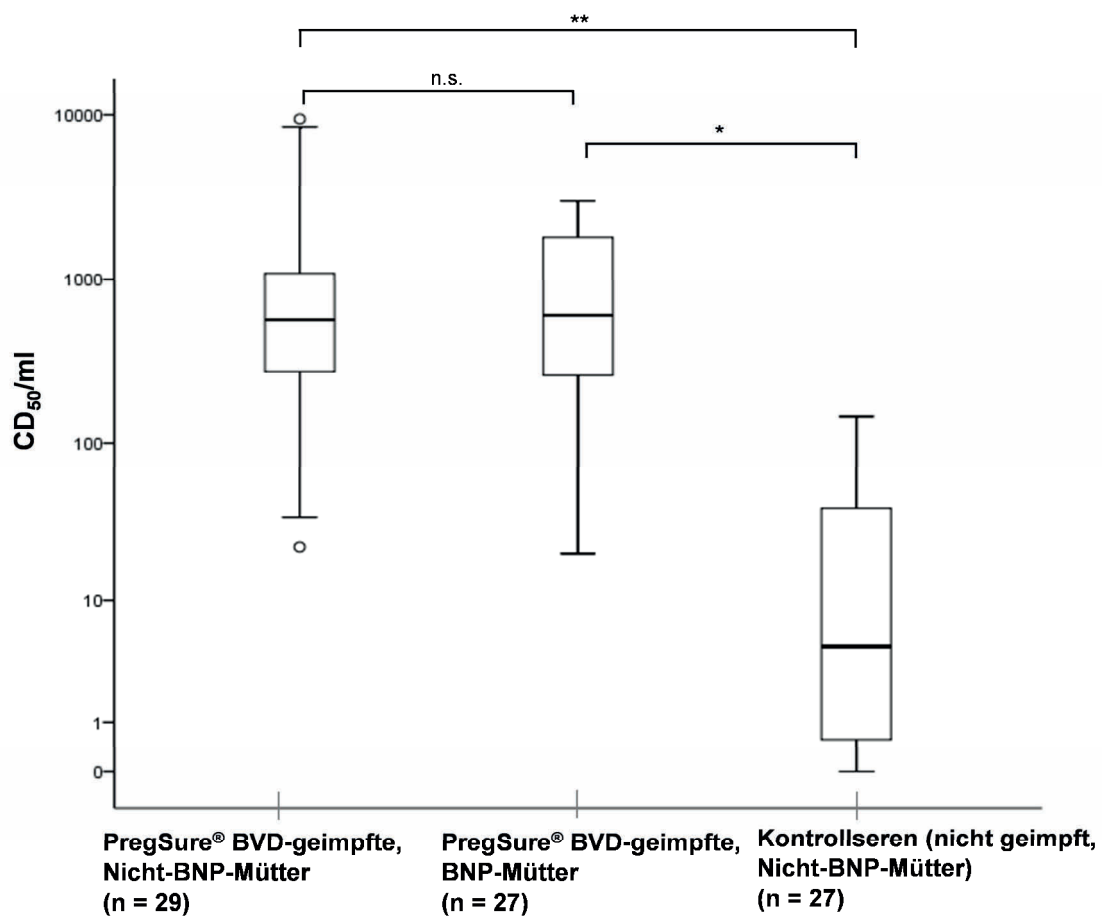


Abbildung 18: Zytotoxische Aktivität der untersuchten Serumproben (n = 83)

Dargestellt ist die zytotoxische Aktivität der Serumproben als Box-Whisker-Plot. Untersucht wurden insgesamt 83 Proben, davon stammten 29 Proben von PregSure® BVD-geimpften Nicht-BNP-Müttern und 27 von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern. Als Kontrollen dienten 27 Serumproben von nicht gegen BVDV-geimpften Kühen.

O Extremwert, Bonferroni-Test für unabhängige Stichproben: ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

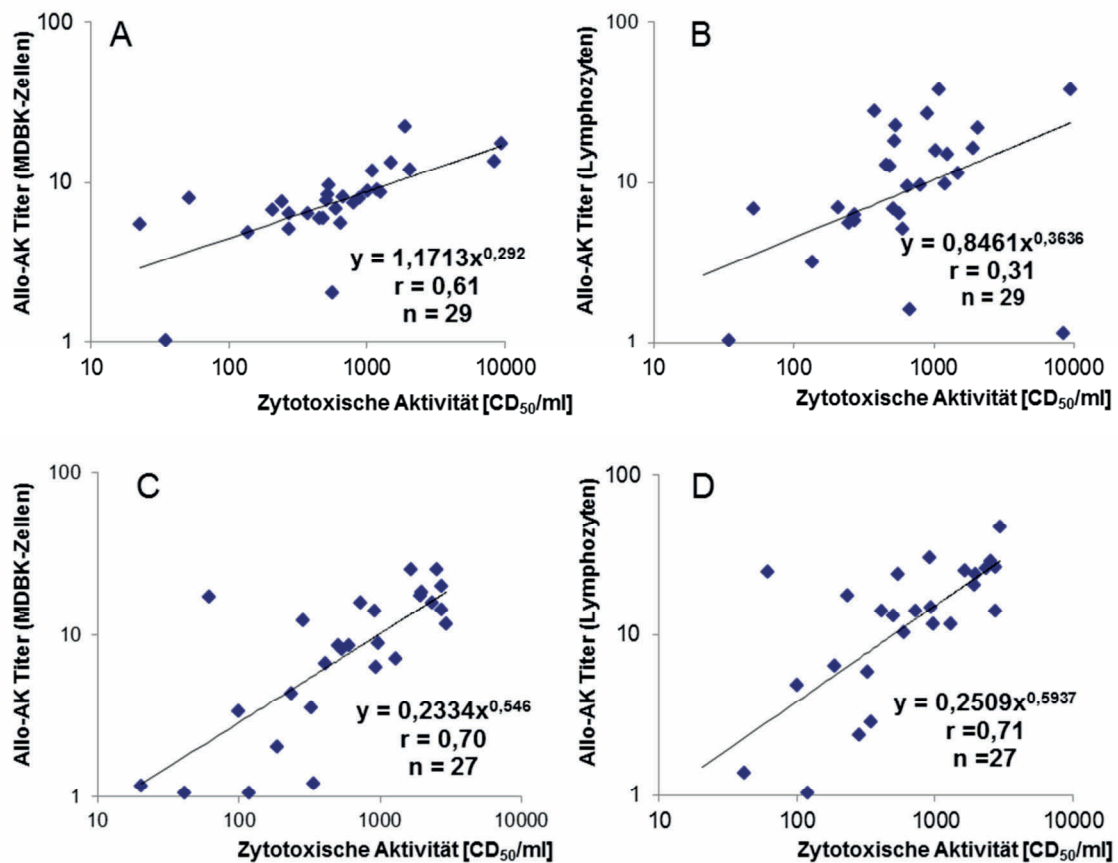


Abbildung 19: Korrelation zwischen der Komplement-abhängigen Zytotoxizität und dem Allo-AK-Titer von Rinderserumproben.

Ergebnisse des Zytotoxizitätstests (MTT-Tests) und der DFZM-Allo-AK-Tests. Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Nicht-BNP-Müttern ($n = 29$) mit den jeweiligen DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titern [A] und DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titern [B] sowie Serumproben von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern ($n = 27$) mit den entsprechenden DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titern [C] und DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titern [D].

3.1.2 Induktion von Apoptose und Nekrose

Um zu klären, ob die Allo-AK in der Lage sind, bei den Zielzellen Apoptose oder Nekrose auszulösen, wurde ein kommerziell erhältliches Apoptose-Assay (Annexin V-FITC-Assay Kit, AbD Serotec) verwendet und die Testansätze mit der Durchflusszytometrie ausgewertet. Hierzu wurden MDBK-Zellen und die fraglichen Serumproben über 72 h koinkubiert. Es wurden insgesamt 80 ausgewählte Rinderserumproben eingesetzt, davon stammten 44 von PregSure® BVD-geimpften Kühen, 36 stammten von Kühen in den Kontrollbetrieben. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Serum verwendet und als Positivkontrolle diente 0,25 %-ige Formaldehydlösung, mit der die Zellen für 4 h inkubiert wurden.

Am Ende der Inkubationszeit befanden sich in den Zellkulturansätzen zwischen 30,3 % und 64,7 % nekrotische und zwischen 1,8 % und 5,6 % apoptotische Zellen in den Negativkontrollansätzen sowie zwischen 84,4 % und 94,0 % nekrotische und zwischen 2,9 % und 11,6 % apoptotische Zellen in den Positivkontrollansätzen (**Abbildung 20**). Während sich die Prozentsätze bei den nekrotischen und lebenden Zellen in Abhängigkeit von der Herkunft der Serumprobe hoch signifikant unterschieden ($p < 0.001$; ANOVA), war der Unterschied bei den apoptotischen Zellen statistisch nicht zu sichern ($p > 0,05$). Bei den apoptotischen Zellen zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Allo-AK-haltigen Serumproben und den Kontrollseren ($p > 0,05$). Der Anteil der nekrotischen Zellen war bei den Allo-AK-haltigen Serumproben aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben im Mittel signifikant größer als bei den Serumproben aus den Kontrollbetrieben und der Negativkontrolle ($p \leq 0,01$). Der Prozentsatz der lebenden Zellen war unter dem Einfluss der Allo-AK-haltigen Seren signifikant reduziert ($p \leq 0,01$), allerdings war auch der Anteil an vitalen Zellen, die mit den Kontrollserumproben inkubiert worden waren, im Vergleich zur Negativkontrolle schwach signifikant ($p \leq 0,05$) niedriger.

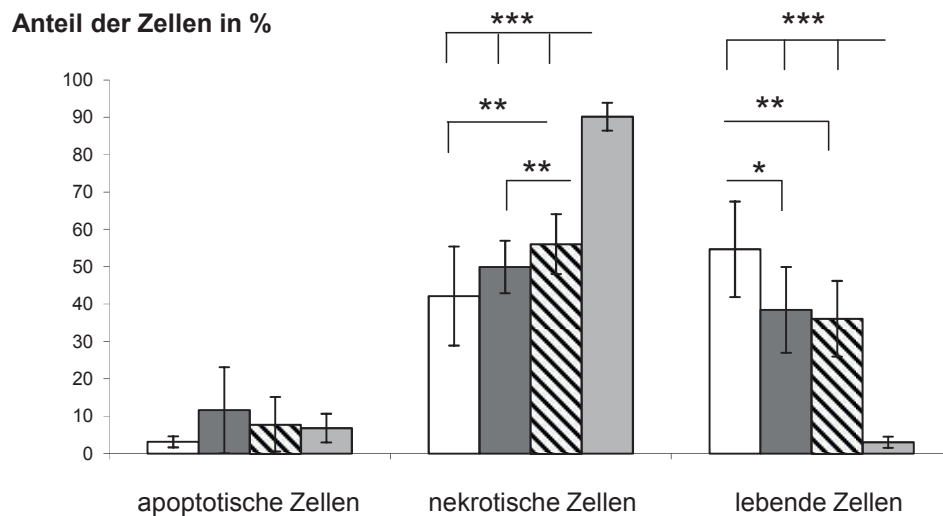


Abbildung 20: Anteile apoptotischer und nekrotischer MDBK-Zellen nach der Einwirkung von Rinderserumproben.

Ergebnisse im Apoptose- und Nekrosetest. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen.

weiße Säulen: Negativkontrollen (n = 5).

graue Säulen: Serumproben aus den Kontrollbetrieben E und F (n = 36).

gestreifte Säulen: Allo-AK-haltigen Seren aus den PregSure® BVD-Impfbetrieben (n = 44).

hellgraue Säulen: Positivkontrollen (n = 5)

ANOVA: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

3.1.3 Steigerung der Zytophagozytose durch Makrophagen

Für die Phagozytose-Versuche wurden Monozyten aus Rinderblut isoliert und zur Ausdifferenzierung zu Makrophagen für 7 Tage in speziellen Zellkulturbeuteln (VueLife®-Zellkulturbeutel, Südlaborbedarf GmbH) kultiviert.

Als Zielzellen dienten BL-3-Zellen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Fa. Enzo® Life Sciences) angefärbt worden waren. Diese angefärbten BL-3-Zellen wurden dann mit den Allo-AK-haltigen Serumproben für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden diese BL-3-Zellen mit den Makrophagen für 4 h bzw. 18 h koinkubiert. Die Auswertung des Tests erfolgte im Durchflusszytometer, wobei als Parameter jeweils der Anteil CFSE-positiver Makrophagen im Auswertfenster R1 sowie der Anteil CFSE-positiver BL-3-Zellen im Auswertfenster R2 betrachtet wurden. Wegen des großen Zeitaufwands und der aufwändigen Methodik konnten im Rahmen dieser Arbeit am Ende des Projekts nur 2 Serumproben von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern und einer Serumprobe aus einem Kontrollbetrieb geprüft werden.

In dem Versuchsansatz mit 4 h Inkubationszeit (**Abbildung 21A**) konnte beobachtet werden, dass der Anteil CFSE-positiver Makrophagen im Auswertfenster R1 um den Faktor ca. 3,6 größer war, wenn die BL-3-Zellen mit Allo-AK-haltigen Seren von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern inkubiert worden waren anstatt mit der Kontrollserumprobe oder keiner Serumprobe. Der Anteil der CFSE-positiven BL-3-Zellen im Auswertfenster R2 war in den Ansätzen der Allo-AK-haltigen Serumproben allerdings nur geringfügig niedriger als in den anderen Ansätzen. Dagegen war nach 18-stündiger Inkubation mit einer Allo-AK-haltigen Serumprobe der Anteil an CFSE-positiven BL-3-Zellen (Auswertfenster R2) im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Serum bzw. zum Ansatz mit der Kontrollserumprobe um ca. die Hälfte reduziert. Der Anteil CFSE-positiver Makrophagen war in allen Ansätzen zwar kleiner als nach der vierstündigen Inkubation. Dennoch war der Anteil in den Ansätzen mit der Serumprobe von einer PregSure® BVD-geimpften BNP-Mutter auch hier größer als in den beiden anderen Ansätzen (**Abbildung 21B**).

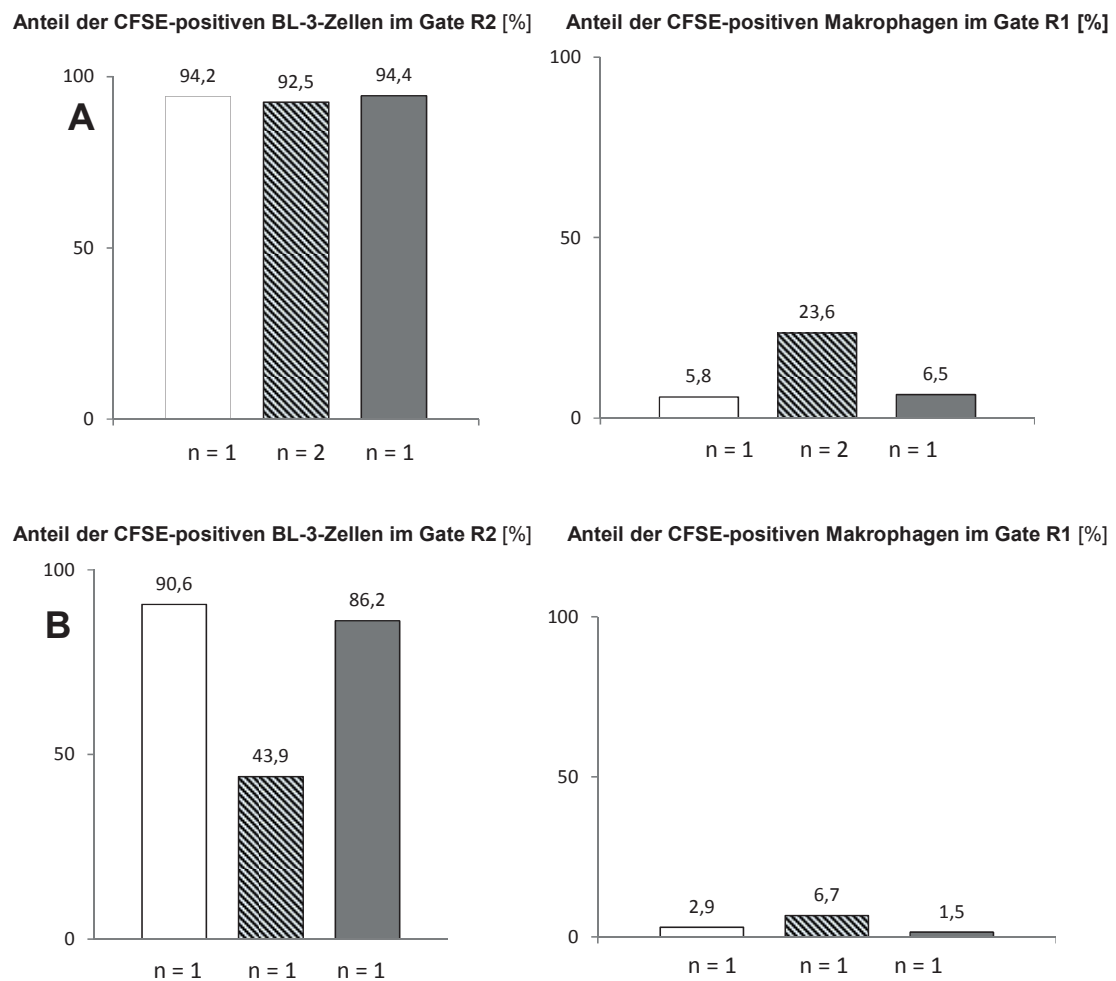


Abbildung 21: Einfluss von Rinderserumproben auf die Zytophagozytose von BL-3-Zellen durch Makrophagen.

Ergebnisse des Phagozytostests. Werte nach Inkubation über 4 h **[A]** und 18 h **[B]**. Arithmetische Mittelwerte aus Doppelansätzen bzw. arithmetische Mittelwerte aus Doppelansätzen von 2 Serumproben.

weiße Säulen: Negativkontrolle (Ansätze ohne Serum).

gestreifte Säulen: Serumproben von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern.

graue Säulen: Serumprobe aus einem Kontrollbetrieb.

3.2 **Kompetition von Alloantikörpern in Rinder- serumproben mit MHC I-spezifischen, monoklonalen Antikörpern um die Bindung an MDBK-Zellen**

Im kompetitiven DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test wurde geprüft, ob sich die Bindung der MHC I-spezifischen, monoklonalen Antikörper IL-A88 und W6/32 an MDBK-Zellen durch die Allo-AK in den Serumproben inhibieren lässt, wenn man diese zuerst mit den Zielzellen inkubiert. Für diese Untersuchungen wurden unter den archivierten Rinderserumproben 6 im DFZM-Allo-AK-Test hochtitrig positiv getestete Proben, 4 davon von BNP-Muttertieren, und 6 Allo-AK-negative Proben aus den Kontrollbetrieben E und F ausgesucht.

Weder die Allo-AK-haltigen Serumproben noch die Kontrollserumproben waren im Mittel dazu in der Lage, die Bindung der beiden monoklonalen Antikörper an die MDBK-Zellen signifikant zu beeinflussen (**Abbildung 22**). Zwar konnte die Bindung von IL-A88 durch die Allo-AK-haltigen Seren um durchschnittlich 25,6 Prozentpunkte in der Verdünnung 1:12,5, bzw. 23,4 Prozentpunkte in der Verdünnung 1:25 reduziert werden, allerdings hatten die negativen Kontrollseren eine annähernd gleich große Wirkung (durchschnittlich 20,0 Prozentpunkte in 1:12,5, bzw. 18,1 Prozentpunkte in 1:25) (**Abbildung 22A**). Bei Verwendung von W6/32 fand im Mittel keine Inhibition statt, die Bindung des Antikörpers an die MDBK-Zellen war im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Serumprobe sogar durchschnittlich um ca. 16,6% bei 1:12,5 bzw 7,4 % bei 1:25 erhöht (**Abbildung 22B**).

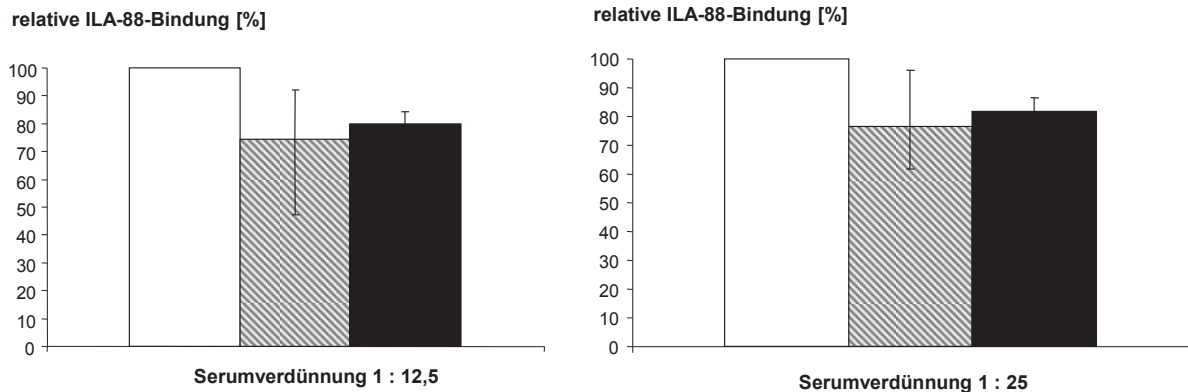
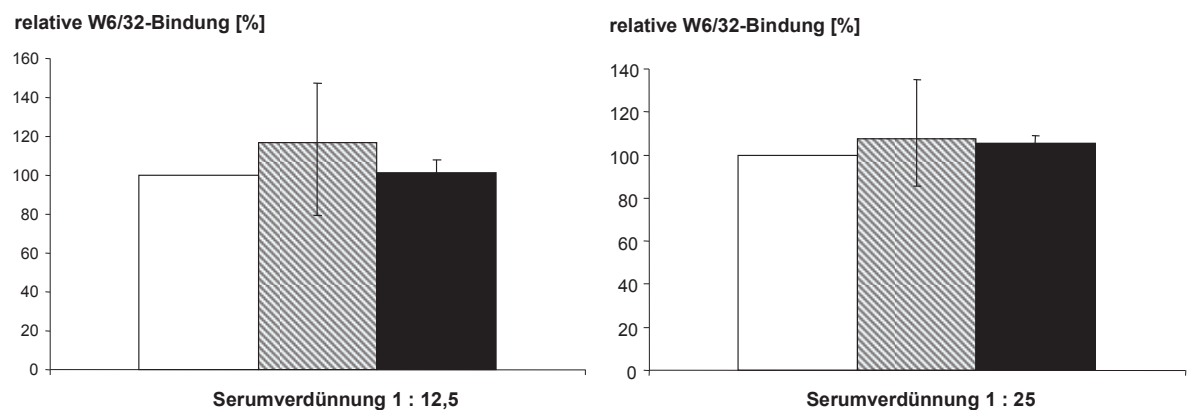
A**B**

Abbildung 22: Bindung der MHC I-spezifischen monoklonalen Antikörper IL-A88 [A] und W6/32 [B] an mit Alloantikörpern vorinkubierte MDBK-Zellen.

Ergebnisse des kompetitiven DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Tests. Die Säulen repräsentieren arithmetische Mittelwerte, die dünnen Balken Maxima und Minima. Die fraglichen Rinderserumproben wurden jeweils in den Verdünnungen 1:12,5 und 1:25 getestet

weiße Säulen: Negativkontrollen (Ansätze ohne Serum; n = 2, das Signal dieser Ansätze in der DFZM wurde auf 100 % gesetzt).

gestreifte Säulen: Allo-AK-haltige Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen in dem Betrieb A (n = 6).

schwarze Säulen: Serumproben aus den Kontrollbetrieben E und F (n = 6).

3.3 Immunglobulinklasse und -subtyp

Um zu bestimmen, welcher Immunglobulinklasse die Allo-AK in Rinderserumproben angehörten, wurde der DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test verwendet, wobei gegen bovines IgG-, IgG₁-, IgG₂- und IgM gerichtete Sekundärantikörpern eingesetzt wurden. Zu dieser Untersuchung wurden unter den archivierten Rinderserumproben 28 Allo-AK-haltige Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen (8 BNP-Mütter, 20 Nicht-BNP-Mütter) und 32 Serumproben aus den beiden Kontrollbetrieben E und F ausgewählt. Bei den Allo-AK-haltigen Serumproben wurden dabei sowohl hochtitrige als auch mitteltitrig Proben (Allo-AK-Titer gemessen im DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Test) berücksichtigt.

Unabhängig von der Spezifität des eingesetzten Sekundärantikörpers wiesen die Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen hoch signifikant höhere Allo-AK-Titerwerte auf als die Kontrollserumproben ($p \leq 0,001$) (**Abbildung 23**). Während die Kontrollserumproben in allen Testvarianten annähernd denselben niedrigen Allo-AK-Titer von durchschnittlich 0,97 bis 1,05 besaßen, waren sie in den Allo-AK-haltigen Proben unterschiedlich hoch. Dabei wurden die höchsten Titerwerte mit den IgG₁-spezifischen Sekundärantikörpern ermittelt. So war im IgG₁-DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test auch die durchschnittliche Titerdifferenz zwischen positiven und negativen Proben mit 11,31 am größten. Mit einem Durchschnittswert von 2,28 wurden die niedrigsten Titer in Allo-AK-haltigen Proben mit dem IgM-DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test gemessen.

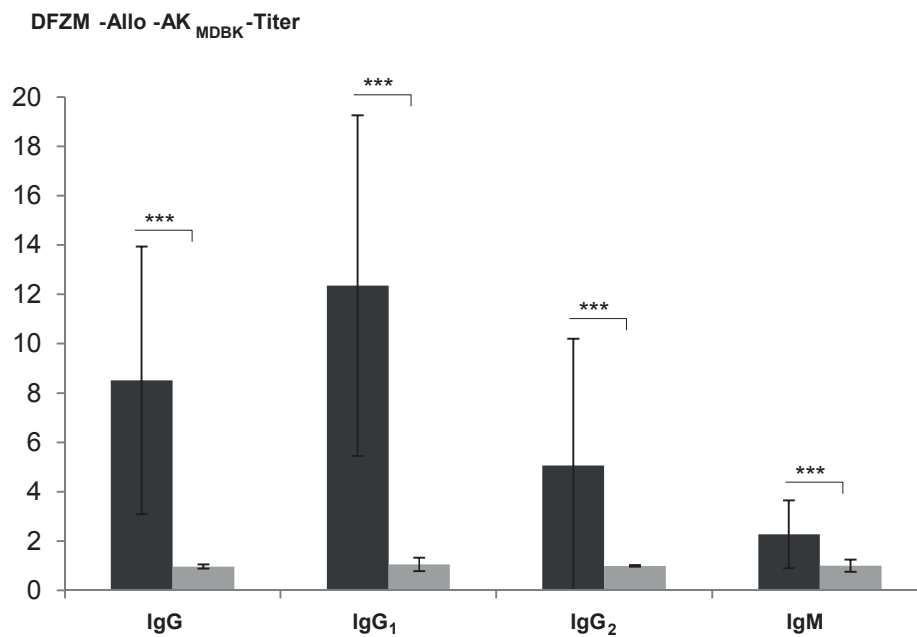


Abbildung 23: Titer der Alloantikörper in Rinderserumproben nach Immunglobulinklassen bzw. -subtypen.

Ergebnisse des DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Tests unter der Verwendung verschiedener Sekundärantikörper. Die Säulen repräsentieren arithmetische Mittelwerte.

schwarze Säulen: Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen in den Betrieben A und B (n = 28).

graue Säulen: Serumproben aus den Kontrollbetrieben E und F (n = 32).

Student`s T-Test: *** $p \leq 0,001$

V Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Assoziation zwischen der Impfung gegen die Bovine Virusdiarrhoe mit dem Impfstoff Pregsure® BVD und dem Auftreten von BNP einerseits und dem Auftreten von Allo-AK im Serum weiblicher adulter Rinder andererseits belegt. Dabei war die beobachtete Allo-Reaktivität der Serumproben gegen alle untersuchten Zellen bovinen Ursprungs (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten aus dem peripheren Blut, Zellen der Zelllinien BL-3 und MDBK) gerichtet.

1 Etablierung und Evaluierung der Testmethoden zum Nachweis von Alloantikörpern

1.1 Nachweis BNP-assoziiierter Alloantikörper mit der Durchflusszytometrie

Im Mittelpunkt der Arbeiten standen zunächst die Etablierung und Evaluierung eines Tests, mit dem Alloantikörper (Allo-AK) in Serumproben von Rindern unter Verwendung verschiedener Testzellen sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisbar sind. Hierzu wurde die am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen entwickelte und auf der Durchflusszytometrie beruhende Methode (Bridger *et al.* 2011) zum DFZM-Allo-AK-Test weiter entwickelt. Dieselbe Messmethodik wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bereits zur Erforschung der BNP genutzt (Bastian *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011, Kasonta *et al.* 2014). Die Theorie, dass die BNP-assoziierten Allo-AK auch gegen Thrombozyten gerichtet sind, wurde bisher aber nur mittels Immunfluoreszenzmikroskopie verifiziert (Assad *et al.* 2012). Basierend auf Literaturhinweisen, wonach die Analyse von Thrombozyten im Durchflusszytometer grundsätzlich möglich ist (Ault 1993, Pintado *et al.* 1995), wurde im Rahmen dieser Arbeit deshalb erstmals ein DFZM-Allo-AK-Test entwickelt, um auch die gegen Thrombozyten gerichteten Allo-AK quantitativ nachweisen zu können.

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden zunächst Leukozyten und Thrombozyten als Testzellen ausgewählt, da diese Blutzelltypen bei der Symptomatik und den hämatologischen Befunden der BNP, nämlich Blutungen, Thrombozytopenie und Leukopenie, im Vordergrund stehen. Da die Leukopenie dabei Lymphozyten, Granulozyten, und Monozyten betreffen kann (Bauer *et al.* 2009, Kappe

et al. 2010, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011, Friedrich *et al.* 2011) wurden diese drei Zellpopulationen jeweils einzeln analysiert.

Die als Testzellen benötigten Blutleukozyten und -thrombozyten wurden von Spenderkälbern gewonnen. Voraussetzung für die Auswahl dieser Kälber war, dass sie höchstens drei Monate alt und klinisch gesund waren. Außerdem mussten sie aus BVDV-unverdächtigen Betrieben stammen, in denen keine Impfung gegen BVDV durchgeführt wurde und keine BNP-Fälle aufgetreten waren. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Test-Blutzellen über das Vorhandensein von BVDV-Antikörpern, einer BVDV-Infektion oder einer BNP-Erkrankung bei den Spenderkälbern in irgendeiner Weise das Testergebnis der untersuchten Serumproben beeinflussen.

Reproduzierbarkeit mit verschiedenen Spenderkälbern

Schließlich wurden für die Etablierung der DFZM-Allo-AK-Tests und bei deren Einsatz in der Fall-Kontroll-Studie Blutzellen von insgesamt drei verschiedenen Spenderkälbern verwendet. Die Beprobungszeiträume variierten dabei je nach Spenderkalb vom 3. bis 78. Lebenstag. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte kein altersabhängiger Unterschied in der Bindungsfähigkeit der Leukozyten für Allo-AK festgestellt werden. Dies stimmte mit den Berichten anderer Untersucher überein, wonach die Empfänglichkeit von Kälberleukozyten für die Bindung der BNP-assoziierten Allo-AK nicht vom Alter der Kälber abhängt (Bridger *et al.* 2011, Assad *et al.* 2012). Dennoch waren die mit den Zellen verschiedener Kälber ermittelten Messwerte nicht identisch. Auch schon zuvor war berichtet worden, dass die Blutleukozyten verschiedener neugeborener Kälber sich in ihrer Affinität zur Bindung von Allo-AK aus den Seren von BNP-Müttern, unterscheiden (Bridger *et al.* 2011). Immerhin ergab die Korrelationsanalyse in der vorliegenden Studie, dass die mit den Zellen von zwei verschiedenen Spenderkälbern gemessenen Titerwerte einer Serumprobe miteinander korrelierten. Am Besten korrelierten die mit Lymphozyten ermittelten Allo-AK-Titer ($r = 0,92$), während dies bei den mit Monozyten ($r = 0,86$) und Granulozyten gemessenen Allo-AK-Titern ($r = 0,67$) weniger deutlich ausgeprägt war. Trotzdem ergab die Korrelationsanalyse zumindest für die mit den Spenderkälbern 2 und 3 ermittelten Daten gute Übereinstimmungen. Da die MHC I-Moleküle einen ausgeprägten Polymorphismus aufweisen, kann sowohl die Erkennung der Zielzellen durch die Antikörper als auch die Bindungsaffinität der Antikörper zu diesen zwischen verschiedenen Individuen variieren (Foucras *et al.* 2011).

Relativ geringe Bindungsreaktivität der Granulozyten

Bei der Untersuchung aller zur Verfügung stehenden Rinderserumproben im DFZM-Allo-AK_{Leuko}-Test stellte sich heraus, dass die ermittelten Titer generell niedriger ausfielen, wenn Granulozyten anstelle von Lymphozyten oder Monozyten als Testzellen verwendet wurden. Dieser Befund steht im Einklang mit den Beobachtungen anderer Untersucher, wonach Allo-AK aus den Serumproben von BNP-Muttertieren vor allem an Lymphozyten (Bastian *et al.* 2011) bzw. Lymphozyten und Monozyten (Bridger *et al.* 2011) binden. Ihre Feststellung, dass Allo-AK nur in geringerem Umfang auf Granulozyten nachweisbar waren, könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum die mit Granulozyten ermittelten Messwerte zwischen den zwei Spenderkälbern weniger gut korrelierten (siehe oben).

Die Beobachtungen deuten jedenfalls darauf hin, dass die Blutzelltypen hinsichtlich ihrer Kapazität, die BNP-assoziierten Allo-AK auf ihrer Oberfläche binden zu können, verschieden sind. Dies könnte wiederum mit dem Expressionsmuster der MHC I-Moleküle auf der Oberfläche der verschiedenen Zelltypen zusammenhängen, vorausgesetzt, MHC I-Antigen(e) aus dem PregSure® BVD-Impfstoff ist/sind tatsächlich die Ursache für die Alloimmunisierung. In diesem Fall stellten die MHC I-Moleküle auf den Blutzellen und den Blutvorläuferzellen im Knochenmark die Angriffspunkte für die Allo-AK dar. Die zunächst vorherrschende Meinung war, dass MHC I-Moleküle auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden sind (Schütt and Bröker 2011). Diese Theorie konnte aber in Studien mit humanem Gewebe und Rattengewebe nicht bestätigt werden, denn hier war MHC I mittels Immunfluoreszenz nur auf lymphoiden Zellen, Epithelzellen und Endothelzellen nachweisbar (Fleming *et al.* 1981, Metzger *et al.* 2000, Deutsdens 2012). Zudem ist die Anzahl der exprimierten MHC I-Moleküle gewebsabhängig unterschiedlich. So weisen lymphoide und myeloide Knochenmarksvorläuferzellen eine starke MHC I-Expression auf, Erythrozytenvorläuferzellen dagegen nur eine geringe (Brown *et al.* 1979, Deutsdens 2012). Von den peripheren Blutzellen exprimieren vor allem Lymphozyten und Thrombozyten die MHC I-Moleküle stark, die polymorphkernigen Zellen aber nur wenig und Erythrozyten überhaupt nicht (Brown *et al.* 1979). Neuere Veröffentlichungen stützen ebenfalls die These, dass die Menge des an der Zelloberfläche exponierten MHC I den entscheidenden Faktor für die Bindung der BNP- bzw. PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK an die jeweiligen Zellen darstellt. So ließen sich mittels indirekter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie signifikant höhere MHC I-Expressionslevel auf mononukleären Leukozyten des Rindes als auf Thrombozyten und Granulozyten nachweisen (Bell *et al.* 2015). Die beschriebenen

Expressionsmuster stimmen jedenfalls mit dem in dieser Arbeit und von anderen Autoren beobachteten Bindungsverhalten der Allo-AK an die verschiedenen Blutzelltypen überein (Bridger *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Deutszens 2012).

Pardon *et al.* (Pardon *et al.* 2011) konnten in Knochenmarksausstrichen auch eine Bindung der Allo-AK an kernhaltige Leukozyten-Vorläuferzellen nachweisen. Andererseits passt ihr Befund, dass Megakaryozyten keine Bindung zeigten, nicht in die Theorie von der MHC-I-vermittelten Alloimmunität, denn dieser Zelltyp ist bei BNP-kranken Tieren ebenfalls depletiert (Bauer *et al.* 2009, Friedrich *et al.* 2009b, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Buck *et al.* 2011). Umgekehrt passt zu dieser Theorie auch nicht, dass bei der BNP nicht auch weitere MHC I-exprimierende Zellen, wie z.B. Epithel- und Endothelzellen, geschädigt werden. Kälberendothelzellen und Knochenmarkszellen präsentieren im Vergleich zu peripheren Blutleukozyten allerdings eine viel kleinere Menge an MHC I-Antigenen auf der Zelloberfläche und binden geringere Mengen an BNP-Allo-AK (Benedictus *et al.* 2015). Diese Mengen reichen möglicherweise nicht aus, um erkennbare Schäden zu verursachen.

Allerdings sind bei den BNP-Kälbern neben den Thrombozyten alle Subpopulationen der Leukozyten, insbesondere auch die neutrophilen Granulozyten, von der Depletion betroffen (Bauer *et al.* 2009, Kappe *et al.* 2010, Pardon *et al.* 2010, Bell 2011, Friedrich *et al.* 2011). Die Granulozyten werden also entweder ebenfalls von den Allo-AK angegriffen oder im Rahmen der immunpathologischen Reaktion auf eine andere Weise eliminiert. Der DFZM-Allo-AK_{Granulo}-Test zeigte durchaus auch eine gewisse Bindung der Allo-AK an die Granulozyten. In einer Analyse mittels Immunfluoreszenzmikroskopie banden die verwendeten Allo-AK sogar an alle Granulozyten (Assad *et al.* 2012). Möglicherweise beruht die ausgeprägte Neutropenie darauf, dass Granulozyten besonders empfindlich auf die Bindung von Allo-AK an ihre Zelloberfläche reagieren.

Eignung von BL-3- und MDBK-Zellen als Testantigene

Da die Verwendung von Leukozyten und Thrombozyten aus Frischblutproben als Testzellen mit den Nachteilen verbunden ist, dass ständig geeignete Spenderkälber zur Verfügung stehen müssen und die mit Zellen von verschiedenen Kälbern ermittelten Titer variieren, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Allo-AK in Serumproben von BNP-Müttern auch an bestimmte bovine Zelllinien binden. Zu diesem Zweck wurden die bovinen Zelllinien BL-3- und MDBK-Zellen verwendet und der DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Test bzw. der DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test etabliert.

BL-3-Zellen wurden ausgewählt, da sie von Lymphosarkom-Zellen eines Rindes abstammen und den bovinen Lymphozyten ähnlich sind, die in der Pathogenese der BNP als Zielzellen der Allo-AK eine wichtige Rolle spielen. Technisch ist bedeutsam, dass BL-3-Zellen in Suspension wachsen und sich ohne großen Aufwand kultivieren und als Testzellen gewinnen lassen. Die ebenfalls vom Rind stammenden, aber adhärent wachsenden MDBK-Zellen werden standardmäßig zur *in vitro*-Vermehrung von BVD-Viren verwendet. Außerdem ist die MHC I-Dichte auf MDBK-Zellen ähnlich groß wie die auf bovinen Monozyten (Bell *et al.* 2015).

Wie die Untersuchungen ergaben, waren beide Zelllinien gut geeignet, um die BNP-assoziierten Allo-AK quantitativ nachzuweisen. So korrelierten die mit ihnen in den beiden Pregsure® BVD-Impfbetrieben ermittelten Allo-AK-Titer sowohl untereinander ($r = 0,91$) sehr stark, als auch mit den Titern, die mit Lymphozyten *ex vivo* gemessen wurden (BL-3-Zellen: $r = 0,82$; MDBK-Zellen: $r = 0,83$). Die Tatsache, dass zur Herstellung des PregSure® BVD-Impfantigens eine bovine Nierenzelllinie verwendet wurde, welche von MDBK-Zellen abstammte (Bastian *et al.* 2011, Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Anonym 2016), verleiht den im DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test erzielten Ergebnissen besondere Brisanz. So kann die hohe Korrelation zwischen den mit Lymphozyten und den mit MDBK-Zellen gemessenen Werten als weiterer Hinweis auf den ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von zellulären Antigenen im Impfstoff (Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011) und dem Auftreten von Allo-AK bei PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern angesehen werden.

Zur Erforschung der BNP-assoziierten Allo-AK wurden MDBK-Zellen und BL-3-Zellen mittlerweile auch schon von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt (Bastian *et al.* 2011, Deutskens *et al.* 2011, Schumann 2011, Bell *et al.* 2015, Benedictus *et al.* 2015) (Deutskens 2012).

1.2 Nachweis BNP-assoziiierter Alloantikörper mit der Serumlängsamagglutination

Mit dem Serumlängsamagglutinationstest (SLA-Test) unter Verwendung von BL-3-Zellen als Testantigen ist es gelungen, neben den durchflusszytometrischen Tests eine weitere Nachweismethode für Allo-AK in Serumproben von Rindern zu entwickeln. Das hier verwendete Testformat entspricht im Prinzip einem klassischen Serumlängsamagglutinationstest (Wiesner and Ribbeck 2000, Schütt and Bröker 2011). Vergleichbare Tests werden im Rahmen der Infektionsdiagnostik zum indirekten Erregernachweis verwendet, beispielsweise zum Nachweis von Antikörpern gegen

Brucellen in Blut- und Milchserum (Wiesner and Ribbeck 2000). Wie bei jenen SLA-Tests wurde die Auswertung auch beim SLA-Test der vorliegenden Arbeit anhand der gebildeten Agglutinate vorgenommen, wobei als Agglutinationstiter der Kehrwert der höchsten Serumverdünnung angegeben wurde, bei der makroskopisch in noch mindestens einem der beiden Parallelansätze Agglutinate erkennbar waren.

Vorteile des SLA-Tests gegenüber den DFZM-Allo-AK-Tests sind die niedrigeren Kosten sowie der geringere methodische und apparative Aufwand bei einer hohen Probenkapazität. Allerdings hängt die Auswertung des SLA-Tests theoretisch stärker von der ablesenden Person ab, weshalb die Messergebnisse des DFZM-Allo-AK-Tests zuverlässiger erscheinen. Bei der experimentellen Prüfung korrelierten die Agglutinationstiter der 86 getesteten Serumproben aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben dennoch recht gut mit den DFZM-Allo-AK-Titern. Besonders hohe Korrelationskoeffizienten bestanden zu den mit BL-3-Zellen ermittelten ($r = 0,89$), aber auch zu den mit MDBK-Zellen, Lymphozyten und Monozyten gemessenen Titern ($r = 0,84$ bzw. $0,81$ bzw. $0,80$). Die schwächere Korrelation mit den DFZM-Allo-AK_{Granulo-} ($r = 0,60$) und DFZM-Allo-AK_{Thrombo-} Titern ($r = 0,68$) könnte auf größere Unterschiede zwischen diesen verschiedenen Zelltypen hinsichtlich der relevanten Rezeptoren hindeuten.

2 Assoziation von Alloantikörpern in Serum- und Kolostrumproben mit der PregSure® BVD-Impfung

Die etablierten DFZM-Allo-AK- und SLA-Tests wurden dann dazu verwendet, um das Vorkommen von Allo-AK bei Kühen in Abhängigkeit von der Impfung gegen BVDV sowie dem im Betrieb eingesetzten BVD-Impfstoff zu beleuchten. Hierzu wurden die Allo-AK-Titer in Serumproben von weiblichen Rindern in 6 verschiedenen Betrieben ermittelt. Die erzielten Ergebnisse unterstützen die in Fachkreisen favorisierte These, wonach der Impfstoff PregSure® BVD bei den geimpften Rindern die Bildung von Allo-AK anstößt, diese impfinduzierten Allo-AK mit dem Kolostrum in das neugeborene Kalb gelangen und dort die Pathogenese der BNP auslösen, wenn das betroffene Kalb entsprechend empfänglich ist. Dieser Zusammenhang wurde unter anderem durch epidemiologische Studien, in denen die PregSure® BVD-Impfung als entscheidender Risikofaktor für das Auftreten von BNP ermittelt wurde, nahegelegt (Bastian *et al.* 2011,

Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Lambton *et al.* 2012, Sauter-Louis *et al.* 2012).

Signifikante Unterschiede zwischen den Betrieben mit unterschiedlichem BVD-Impfstatus

Beim Vergleich der 6 getesteten Betriebe untereinander waren in den Serumproben aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben mit allen verwendeten Testzellen (Leukozyten, Thrombozyten, BL-3-Zellen, MDBK-Zellen) im Mittel hoch signifikant bzw. signifikant höhere Allo-AK-Titer vorhanden als in den Serumproben aus dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb und dem Bovidec®-Impfbetrieb sowie den beiden Kontrollbetrieben. Diese Ergebnisse stimmen mit mehreren anderen Studien, in denen ebenfalls mittels Durchflusszytometrie signifikant höhere Allo-AK-Titer in Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen im Vergleich zu Proben von Kontrollkühen gefunden wurden, überein (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011, Kasonta *et al.* 2014). Als Kontrollkühe dienten dabei je nach Studie sowohl Kühe aus Herden ohne BNP-Vorgeschichte und ohne Impfungen gegen BVDV, als auch Kühe, die mit einem anderen BVDV-Impfstoff als PregSure® BVD geimpft worden waren und PregSure® BVD-geimpfte Nicht-BNP-Mütter. Als Testzellen wurden in diesen Studien bovine Leukozyten (Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011), bovine Lymphoblasten (Kasonta *et al.* 2014) und MDBK-Zellen (Benedictus *et al.* 2015) verwendet.

Altersabhängigkeit der Allo-AK-Titer

Ein indirekter Hinweis auf den kausalen Zusammenhang zwischen der Verimpfung von PregSure® BVD und der Bildung von Allo-AK ergibt sich außerdem, wenn man die Reaktion in den Allo-AK-Tests dem Alter der betreffenden Kühe in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben gegenüberstellt. So besaßen alle getesteten Kühe im Alter von fünf Jahren Allo-AK, während Allo-AK bei den einjährigen, mit PregSure® BVD geimpften Rindern niemals vorkamen. Dabei stieg der Anteil der Allo-AK-positiven Tiere von der Gruppe der zweijährigen bis zu den fünfjährigen Kühen kontinuierlich an. Leider ließ sich die Impfgeschichte der einzelnen Kühe nicht zurückverfolgen. Man konnte jedoch davon ausgehen, dass in beiden Betrieben alle Kühe spätestens ab dem Alter von zwei Jahren gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Impfschema eine Grundimmunisierung und anschließend jährliche Auffrischungsimpfungen mit PregSure® BVD erhielten. Somit wäre es naheliegend, den mit dem Alter steigenden Anteil an Allo-AK-positiven Tieren im Sinne des Booster-Effekts als

direkte Folge der steigenden Zahl an erhaltenen PregSure® BVD-Impfungen zu interpretieren. Die Beobachtung, dass der Anteil Allo-AK-positiver Tiere unter den mindestens sechsjährigen Kühen deutlich kleiner war als unter den fünfjährigen, widerspricht diese Interpretation nicht. Denn PregSure® BVD wurde in Deutschland erst seit 2004 vermarktet (Anonym 2010a). So ist es gut möglich, dass die zum Zeitpunkt der Probennahme ältesten Kühe (geboren in den Jahren 1999 - 2003) nicht mit PregSure® BVD grundimmunisiert worden waren, sondern mit einem anderen BVDV-Impfstoff.

Die hier vorgestellten Ergebnisse und die daraus abgeleitete Interpretation stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Kasonta *et al.*, wonach das verwendete Impfschema und die Anzahl der Impfungen pro Tier einen bedeutenden Einfluss auf die Allo-Immunisierung durch die Impfung mit PregSure® BVD hat (Kasonta *et al.* 2012). Hierzu passen auch die Ergebnisse der Fall-Kontrollstudie von Jones *et al.* (Jones *et al.* 2013). Diese Autoren entdeckten, dass das Risiko für die Geburt eines BNP-Kalbs bei PregSure® BVD-geimpften Kühen ab der zweiten Laktation größer ist als in der ersten Laktation. Auch scheinen durch erneute Graviditäten die PregSure® BVD-induzierten Allo-AK „geboostert“ zu werden, so dass unmittelbar vor der Geburt besonders hohe Allo-AK-Titer nachgewiesen werden können. Nach der Geburt fallen die Titerwerte ab, was vermutlich auf den plötzlichen Wegfall der alloimmunisierenden fetalene Antigene und auch auf die Translokation der IgG-Antikörper in das Kolostrum zurückzuführen ist (Benedictus *et al.* 2016).

In einer anderen Studie nahm das Risiko für BNP bis zur dritten Geburt der Muttertiere zu, sank allerdings nach der vierten und fünften Geburt wieder ab. (Benedictus *et al.* 2014). Diese Beobachtungen korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da normalerweise das Alter einer Kuh bei der dritten Geburt etwa 5 Jahre beträgt.

Korrelation zwischen den Allo-AK-Titern und den Titern BVDV-neutralisierender Antikörper

Im Vergleich zu anderen BVDV-Vakzinen induziert PregSure® BVD besonders hohe Titer an BVDV-neutralisierenden Antikörpern, was vermutlich auch mit dem in diesem Impfstoff enthaltenen speziellen ISCOM-Adjuvans zusammenhängt (Salt *et al.* 2004, Raue *et al.* 2010, Bastian *et al.* 2011). Die Titer der PregSure® BVD-geimpften Kühe überstiegen sogar die üblicherweise bei natürlich mit BVDV-infizierten Tieren vorkommenden Werte. Dabei wiesen BNP-Mütter im Durchschnitt zehnfach höhere

BVDV-Antikörpertiter auf als PregSure® BVD-geimpfte Nicht-BNP-Mütter (Bastian *et al.* 2011).

Wie die vorliegende Studie ergab, korrelierten nur bei den PregSure® BVD-geimpften Kühen die Titer der neutralisierenden Antikörper mit den DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titern. Auch wenn diese Korrelation mit einem Koeffizienten von $r = 0,66$ nur moderat ausfiel, deutet sie ebenfalls auf die ursächliche Rolle von PregSure® BVD bei der Induktion von Allo-AK hin, zumal bei den mit anderen Vakzinen geimpften Tieren keine Korrelationen nachweisbar waren. Andere Untersucher zeigten, dass es sich bei den BVDV-reaktiven Antikörpern und den Allo-AK um verschiedene Immunglobuline handelt (Bastian *et al.* 2011). Demnach scheint die von PregSure® BVD in der Kuh angestoßene humorale Immunreaktion in ihrer Stärke weniger von der Art des Antigens abhängig zu sein. Für die beobachteten Titerunterschiede zwischen den Tieren könnte es sowohl bei den Anti-BVDV-Titern als auch bei den Allo-AK eine Rolle gespielt haben, wieviele Auffrischungsimpfungen die Tiere vor der Probenentnahme erhalten hatten. Die Titerunterschiede könnten aber einfach auch nur das individuelle Vermögen widerspiegeln, eine Immunreaktion auf ein parenteral appliziertes Antigengemisch zu formulieren; je stärker die induzierte Immunantwort auf das eigentliche BVDV-Impfantigen, desto stärker könnte auch die gleichzeitig ausgelöste alloreaktive Immunreaktion ausgefallen sein. Andere Autoren vermuten ebenfalls, dass BNP-Kühe aufgrund einer genetischen Prädisposition grundsätzlich mit einer gesteigerten Antikörperbildung auf eine Impfung reagieren (Benedictus and Bell 2017). Der mäßige Korrelationskoeffizient und der Befund, dass einige Serumproben relativ hohe BVDV-Antikörpertiter gleichzeitig aber niedrige Allo-AK-Titer aufwiesen, könnte darauf hinweisen, dass die (wiederholte) immunologische Auseinandersetzung mit den in PregSure® BVD enthaltenen Zellresten alleine noch nicht ausreicht, um die Bildung der fatalen alloreaktiven Immunglobuline anzustoßen. Demzufolge könnte auch der Zeitpunkt der Probenahme eine Rolle gespielt haben.

Vorkommen von Alloantikörpern im Kolostrum

Der Vergleich der DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titer in Serum- und Kolostrumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen ergab, dass der Allo-AK-Titer mit einer Ausnahme in der Kolostrumprobe stets höher war als im Serum der betreffenden Kuh. Bei den 13 Kühen aus dem PregSure® BVD-Impfbetrieb A waren die Allo-AK-Titer in den Kolostrumproben im Mittel 1,35-mal so hoch wie die Titer in den Blutseren. Kasonta *et al.* fanden in ihrer Studie ebenfalls die höchsten Gehalte an BNP-assoziierten Alloantikörpern in Kolostrumproben. Milchproben wiesen nur vernachlässigbar geringe

Gehalte an diesen Antikörpern auf (Kasonta *et al.* 2014). Der Nachweis hoher Allo-AK-Titer im Kolostrum steht auch im Einklang mit anderen Studien (Friedrich *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011, Assad *et al.* 2012).

In bovinem Kolostrum macht IgG₁ bis zu 90 % des insgesamt darin enthaltenen Immunglobulins (Gesamt-Ig-Gehalt) aus. Daneben kommen in geringeren Konzentrationen auch IgE, IgM, IgA und IgG₂ vor. Die kolostralen Immunglobuline stammen zum Großteil aus dem Blutserum und werden nur zu einem geringen Teil im Eutergewebe selbst synthetisiert (Tizard 1996, Lipp 2005). Bei IgG₂, IgM und IgA werden kleine Mengen aber auch von Plasmazellen in der Milchdrüse produziert, für den IgG₁-Gehalt des Kolostrums scheint die lokale Synthese jedoch unbedeutend zu sein (Newby and Bourne 1977, Lascelles 1979, Larson *et al.* 1980, Newby *et al.* 1982). Dadurch sind die in Kolostrum bzw. Milch und in Blutserum gemessenen IgG-Gehalte abhängig vom Trächtigkeitsstadium. In den letzten zwei bis drei Wochen vor der Geburt sinkt der IgG₁-Gehalt im Blutserum stark ab, während diese Immunglobuline durch selektiven IgG₁-Transport in der Milchdrüse angehäuft werden. Die in Kolostrum gemessenen IgG-Gehalte variieren stark, je nach Quelle werden Werte von 30–75 mg/ml bzw. 15,3 mg/ml und 176,2 mg/ml angegeben. Für Blutserum liegen die Gehalte zwischen 6 und 15,1 mg/ml (Butler 1983, Lipp 2005). Verglichen mit diesen Zahlen ist das in dieser Arbeit ermittelte Verhältnis der Allo-AK-Titer in Blutserum und Kolostrum auffällig eng. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Ergebnis dadurch beeinflusst war, dass die Blutprobe und die korrespondierende Kolostrumprobe in einigen Fällen zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen worden waren. Es ist aber auch denkbar, dass bei der Aufbereitung der Kolostrumproben für die Messung im DFZM-Allo-AK-Test möglicherweise mit dem Fett ungewollt auch Immunglobuline entfernt wurden.

Höhere Allo-AK-Titer bei BNP-Muttertieren als bei Nicht-BNP-Muttertieren

In den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben konnte man zwischen Kühen, bei denen vorberichtlich wenigstens ein Kalb an BNP erkrankt war, und solchen, bei deren Nachwuchs BNP niemals beobachtet worden war, unterschieden werden. Der Vergleich der Messergebnisse offenbarte, dass BNP-Mütter in allen Varianten des DFZM-Allo-AK-Tests im Mittel hoch signifikant ($p \leq 0,001$) höhere Allo-AK-Titer aufwiesen als die übrigen PregSure® BVD-geimpften Kühe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit mehreren anderen Untersuchungen (Bastian *et al.* 2011, Pardon *et al.* 2011, Kasonta *et al.* 2014, Benedictus *et al.* 2015) und stützen die Theorie, dass das Auftreten der BNP-Erkrankung beim Kalb nicht nur von dessen genetisch bedingter

Empfänglichkeit, sondern auch von der Titerhöhe der Allo-AK im mütterlichen Serum bzw. Kolostrum abhängt. Eine weitere Studie belegt ebenfalls, dass die Höhe des Allo-AK-Titers ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der BNP ist. So besaßen PregSure® BVD-geimpfte BNP-Mütter signifikant höhere Titer an Allo-AK, die auf bovine Leukozyten-Zelllinien mit definierten MHC-I-Allelen zytotoxisch wirkten, als PregSure® BVD-geimpfte Kühe ohne BNP-Kälber. Zudem korrelierte die Anzahl der Zelllinien, die von den Allo-AK einer Kuh erkannt wurden, positiv mit der Höhe des Allo-AK-Titers (Bell *et al.* 2015)

Es scheint allerdings, dass die Pathogenese der BNP komplexer ist als ursprünglich angenommen. Aufgrund des MHC I-Sequenz-Polymorphismus haben BNP-Kühe und Kälber eine Vielzahl an verschiedenen MHC I-Genotypen. Diese Vielfalt erklärt auch, warum in früheren Studien (Ballingall *et al.* 2011b, Benedictus *et al.* 2014) kein Zusammenhang zwischen bestimmten MHC I-Haplotypen und dem Auftreten von BNP gefunden wurde und auch, warum das Auftreten von BNP in anderen Untersuchungen kein erbliches Merkmal der Kälber darstellte (Benedictus and Bell 2017).

3 Alloantikörper bei den mit Bovidec® geimpften Kühen

Allo-AK waren nicht nur bei den PregSure® BVD-geimpften Kühen vorhanden, sondern auch bei einigen Kühen aus dem Bovidec®-Impfbetrieb. Dabei lagen die durchschnittlichen Allo-AK-Titer der Bovidec®-geimpften Kühe im DFZM-Allo-AK_{Lympho}-, DFZM-Allo-AK_{Mono}- und DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test hoch signifikant höher als im Bovilis®-Impfbetrieb, im DFZM-Allo-AK_{Mono}- und DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test unterschieden sie sich auch hoch signifikant von den Titerwerten in den beiden Kontrollbetrieben. Analoge Befunde ergab auch die Untersuchung der Serumproben mit dem SLA-Test auf BL-3-Zellen, obwohl hier nur jede zweite der 316 Serumproben getestet wurde. Dabei waren die Agglutinationstiter im Bovidec®-Impfbetrieb D signifikant ($p \leq 0,01$) höher als im Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb C und in den beiden Kontrollbetrieben E und F, während der Unterschied zu PregSure® BVD-geimpften Kühen nicht signifikant war.

Nach diesen Befunden muss man befürchten, dass auch der Bovidec®-Impfstoff dazu in der Lage ist, die Bildung problematischer Allo-AK zu induzieren. Interessanterweise enthält dieser Impfstoff mit Procision A® das gleiche Adjuvans wie PregSure® BVD. Procision A® ist ein sogenanntes ISCOM-Adjuvans, welches Quil A,

Cholesterol, Amphigen Base und Drakeol 5 enthält (Anonym 2009c). Bei Quil A handelt es sich um einen aufgereinigten Extrakt von Quillaja-Saponinen aus dem südamerikanischen Seifenrindenbaum (Sjölander *et al.* 1997, Demana *et al.* 2004, Harms *et al.* 2008), der zusammen mit dem Antigen und den anderen Inhaltsstoffen des Impfstoffes sogenannte *Immuno-stimulating complexes* (ISCOMS) bilden kann (Lövgren and Morein 1988, Demana *et al.* 2004, Lendemans *et al.* 2005). In dieser Form können diese Adjuvantien sowohl humorale Immunantworten (IgG₁ und IgG₂) als auch T-zell-vermittelte Abwehrreaktionen (Th1 und Th2) gegen Antigene verstärken (Sjölander *et al.* 1997, White *et al.* 2006, Harms *et al.* 2008, Platt *et al.* 2008). Diese potente immunadjuvante Wirkung führt bei PregSure® BVD zu einer guten Immunität gegen die BVDV-Typen 1 und 2 mit sehr hohen Titern an neutralisierenden Antikörpern (Salt *et al.* 2004, Harmeyer *et al.* 2005, Raue *et al.* 2010), welche sogar die bei natürlich infizierten Tieren beobachteten Antikörpertiter übertreffen sollen (Bastian *et al.* 2011). Allerdings sind Quil A-basierte Adjuvantien umstritten, da Quillaja-Saponine mit den Zytoplasmamembranen eukaryontischer Zellen interagieren und dadurch zytotoxisch wirken (White *et al.* 2006, Harms *et al.* 2008). In der Diskussion über die Pathogenese von BNP geriet das Adjuvans Quil A zudem in Verdacht, wegen seiner starken immunadjuvanten Aktivität entscheidend zur Alloimmunisierung beizutragen (Bastian *et al.* 2011, Deutszens *et al.* 2011). Diese Vermutung erschien logisch, da zwar in mehreren inaktivierten BVD-Vakzinen ebenfalls zelluläre Bestandteile als Überreste aus der Impfantigen-Produktion gefunden wurden (Bastian *et al.* 2011), aber nur die mit PregSure® BVD geimpften Kühen hohe Allo-AK-Titer besaßen (Bastian *et al.* 2011). So stützt das hier erstmals belegte Vorkommen von Allo-AK bei den Bovidec®-geimpften Kühen die Hypothese, dass gerade die Kombination aus hochpotentem ISCOM-Adjuvans und homologen zellulären Antigenen in einem parenteral verabreichten Impfstoff zur Entstehung von Allo-AK führt.

Es ist jedoch zu betonen, dass es in der Fachliteratur bisher keinerlei Hinweise auf BNP-Fälle im Zusammenhang mit der Bovidec®-Impfung gibt. Den in dieser Studie mit der Bovidec®-Impfung assoziierten Allo-AK kommt demnach vermutlich keinerlei klinische Bedeutung zu. Auch waren die Titer der Bovidec®-geimpften Kühe im DFZM-Allo-AK-Test im Mittel sehr viel niedriger als die Titer der PregSure® BVD-geimpften Kühe. Deutszens (2012) spekulierte, dass für diese Unterschiede zu PregSure® BVD vielleicht Besonderheiten bei der Formulierung und Prozessierung von dessen Quil A-Adjuvans bedeutsam sind (Deutszens 2012). In PregSure® BVD läge das Adjuvans als Formulierung mit Cholesterin und Amphigen® vor und werde mittels Mikrofluidisierung behandelt. Durch diese Behandlung entstünden gemäß Herstellerangaben nach

technischer Prozessierung Quil-A-Cholesterin-Antigen-Nanokomplexe (Anonym 2004), welche nicht nur die Immunogenität von Virusantigenen, sondern auch von zellulären Kontaminanten steigerten (Deutskens 2012).

Anders als im DFZM-Allo-AK-Test bestand im SLA-Test bezüglich des ermittelten Allo-AK-Titers kein signifikanter Unterschied zwischen den PregSure® BVD-geimpften Kühen und den Bovidec®-geimpften Kühen, wenngleich Median, arithmetischer Mittelwert und Maximum in der Bovidec®-Gruppe niedriger waren. Dies liegt möglicherweise daran, dass die beiden Tests bevorzugt verschiedene Klassen an Allo-AK erfassen. So war der DFZM-Allo-AK-Test strikt auf IgG-Antikörper gerichtet. Andererseits wirken generell IgM-Antikörper im Vergleich zu IgG-Antikörpern in serologischen Tests stärker agglutinierend und Komplement-aktivierend (Tizard 1996). Beim Rind wirken nach Butler *et al.* (1983) vor allem IgA und IgM als Agglutinine. Deshalb ist es denkbar, dass der SLA-Test vor allem Allo-AK dieser Klassen erfasste, es im Hinblick auf die Pathogenese der BNP aber vor allem auf Allo-AK der Klasse IgG ankommt.

Generell ist der Befund, dass virale Inaktivatvakzinen, die in einem System aus homologen Zellen hergestellt werden, geringe Mengen an Alloantigenen enthalten können und dadurch das Risiko einer Alloimmunisierung beeinhalteten, von großer Bedeutung für den Impfstoffeinsatz. Das Beispiel PregSure® BVD zeigt, dass eine solche Alloimmunisierung im ungünstigsten Fall tödliche Konsequenzen für die Nachkommen haben kann und entsprechende Impfstoffe kritisch betrachtet werden müssen. Auch in der Humanmedizin werden Impfstoffe unter Verwendung von humanen Zelllinien hergestellt wie Impfstoffe gegen Hepatitis A (z.B. VAQTA der Fa. Merck und Havrix der Fa. GlaxoSmithKline), Röteln (z.B. MERUVAX II der Fa. Merck, ProQuad der Fa. Merck) und Windpocken (z.B. Varivax der Fa. Merck, ProQuad der Fa. Merck). Für die Herstellung der fraglichen Impfantigene werden die humanen Zelllinien WI38 und MRC-5 verwendet. Beide Zelllinien wurden in den 1960er Jahren aus fetalen Lungenzellen von abortierten Feten gewonnen und bereits seit sehr langer Zeit erfolgreich zur Impfstoffproduktion verwendet. Die auf diesem Weg hergestellten Human-Impfstoffe gelten bisher aber als sicher und effektiv (Anonym 2012b).

Das EU-Genehmigungsverfahren der zur Anwendung beim Rind vorgesehenen Vakzine „CattleMarker IBR Inactivated“ (Fa. Zoetis) bietet andererseits ein aktuelles Beispiel dafür, welche Konsequenzen die zuständigen Behörden und Impfstoffhersteller aus den Erfahrungen mit der BNP ziehen (Anonym 2016). Da „CattleMarker IBR Inactivated“ unter Verwendung der gleichen bovinen Nierenzelllinie (MDBK) hergestellt wird und dasselbe Adjuvans Procision A® enthält wie

PregSure® BVD, zweifelte das Paul-Ehrlich-Institut als deutsche Zulassungsbehörde an der Sicherheit des Impfstoffes. Die bereits vom Hersteller ergriffenen Maßnahmen erschienen aus deutscher Sicht nicht ausreichend. Da die beteiligten EU-Mitgliedsstaaten über diese Frage keine Einigung erzielen, leiteten sie diese zur Klärung dem *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use* (CVMP) der EMA zu. Erst nach eingehender Prüfung und Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses empfahl das Gremium die Genehmigung des Impfstoffes. Nach Ansicht des CVMP konnte belegt werden, dass „CattleMarker IBR Inactivated“ durch Einführung eines Filtrationsschrittes in den Herstellungsprozess weniger zelluläre Antigenreste enthält als PregSure® BVD. Außerdem habe eine Hyperimmunisierungsstudie belegt, dass wiederholte Impfungen mit „CattleMarker IBR Inactivated“ zu keiner mit der PregSure® BVD-Hyperimmunisierung vergleichbaren Bildung von Allo-AK führt. Erst nach Vorlage dieser Belege und dem Vorschlag des Herstellers für ein gezieltes Überwachungs- und Monitoringverfahren empfahl das CVMP schließlich die Zulassung des Impfstoffs (Anonym 2016).

4 Mögliche Mechanismen der Alloantikörper-Wirkung auf die bovinen Zielzellen

Zu Beginn der in dieser Arbeit dargestellten Experimente lagen bezüglich der Wirkmechanismen der BNP-assoziierten Allo-AK auf die bovinen Zielzellen nur vage Hinweise auf eine gesteigerte Zytophagozytose vor (Bauer *et al.* 2009, Pardon *et al.* 2010, Bastian *et al.* 2011, Bridger *et al.* 2011). Die eigenen Untersuchungen fokussierten deshalb auf die direkte und die Komplement-vermittelte zytotoxische Aktivität der BNP- bzw. PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK, auf die Induktion von Apoptose in den Zielzellen und auf deren Opsonierung mit nachfolgender Zytophagozytose.

Direkte Zytotoxizität und Induktion von Apoptose/Nekrose

In mehreren Testreihen an MDBK-Zellen wurde untersucht, ob Allo-AK-haltige Rinderseren auf die Zielzellen unmittelbar zytotoxisch wirken. Bei diesen Untersuchungen wurde die Vitalität der mit den Serumproben kokubierten MDBK-Zellen mit dem MTT-Test quantitativ erfasst. Der MTT-Test nach Tada *et al.* (Tada *et al.* 1986) wurde bereits zuvor erfolgreich dazu eingesetzt, um den vital schädigenden Effekt von verschiedenen Substanzen auf eukaryontische Zielzellen zu messen (Heald *et al.* 1994, Chou *et al.* 1996, Diao *et al.* 1998, Fröhlich 2009, Kerner 2012), unter anderem auch

zum Nachweis zytotoxischer Effekte, die von Komplement vermittelt wurden (Chou *et al.* 1996, Diao *et al.* 1998). In der Fachliteratur ist dokumentiert, dass die Bindung von Antikörpern an Histokompatibilitätsantigene bei den betroffenen Zellen Apoptose auslöst. Beispielweise werden humane T-Lymphozyten apoptotisch, wenn man sie Antikörpern mit Spezifität für das β 2-Mikroglobulin bzw. die α 3-Domäne des HLA-Klasse I-Moleküls aussetzt (Skov *et al.* 1997, Woodle *et al.* 1997). Im gleichen Sinne lösen monoklonale Antikörper, welche gegen Epitope der α 1-Domäne der schweren Kette des HLA-Klasse I-Moleküls gerichtet sind, den apoptotischen Zelltod von aktivierten peripheren T-Lymphozyten und CD40-aktivierten B-Lymphozyten aus. Dabei ist keine sog. Quervernetzung der MHC I-Moleküle (*Cross-linking of MHC I-molecules*) erforderlich, da nicht nur die intakten Antikörper, sondern auch ihre F(ab)'₂- und Fab'-Fragmente in dieser Weise wirksam sind (Genestier *et al.* 1997). Deshalb wurde in den eigenen Untersuchungen neben dem MTT-Test auch ein kommerziell erhältlicher, DFZM-basierter Test eingesetzt, um gezielt zu prüfen, ob die Allo-AK bei den Zielzellen die Prozesse der Apoptose oder Nekrose anstoßen. Aber weder im MTT-Test noch im DFZM-basierten Apoptose-/Nekrose-Test ergaben sich Anhaltspunkte dafür, dass die mit der PregSure® BVD-Impfung assoziierten Allo-AK die Vitalität der Testzellen direkt beeinträchtigten. In anderen Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese der BNP wurden ebenfalls keine Hinweise auf eine direkte zytotoxische Wirkung der als ursächlich inkriminierten Allo-AK gefunden (Pardon *et al.* 2010, Schumann 2011).

Komplement-vermittelte Zytotoxizität

Zur Prüfung auf eine etwaige Komplement-vermittelte zytotoxische Wirkung der Allo-AK wurden im MTT-Test neben den Standard-Testansätzen (MDBK-Zellen unter der Einwirkung der fraglichen Serumprobe) auch solche Ansätze gemessen, denen xenogenes Komplement zusätzlich beigemischt worden war. Gepooltes Blutserum von Meerschweinchen (Fa. Siemens Healthcare) diente dabei als exogene Komplementquelle. Ein eigener toxischer Effekt dieses Komplements war zuvor durch ein Kontrollexperiment (Testansätze auf MDBK-Zellen unter Zusatz von Komplement aber ohne Serumzugabe) ausgeschlossen worden. Tatsächlich reagierten die Allo-AK-haltigen Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen gegenüber den MDBK-Zellen in diesem Testformat signifikant zytotoxischer als Proben von anderen Kühen. Mittlerweile berichteten drei andere Arbeitsgruppen über ganz ähnliche Beobachtungen, auch wenn sie zur Messung der Komplement-vermittelten Zytotoxizität teilweise andere Testzellen (humane Lymphoblasten, bovine Nierenzellen, bovine

Leukozyten und bovine Knochenmarkszellen) sowie ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren (Bell *et al.* 2015) oder DFZM-basierte Verfahren (Kasonta *et al.* 2014, Bell *et al.* 2015, Benedictus *et al.* 2015) einsetzen.

Das Komplementsystem besteht aus einer Vielzahl an Plasmaproteinen und gehört zu den wichtigsten humoralen Abwehrmechanismen der Säugetiere (Tizard 1996, Rainard 2003, Janeway *et al.* 2005, Schütt and Bröker 2011). Prinzipiell kann das Komplementsystem über drei verschiedene Wege aktiviert werden, den sog. klassischen Weg, den Lektinweg und den alternativen Weg (Tizard 1996, Janeway *et al.* 2005, Schütt and Bröker 2011). Die experimentellen Ergebnisse lassen vermuten, dass die PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK das Komplementsystem über den klassischen Weg aktivieren. Dieser unter anderem von Antikörper-Antigen-Komplexen initiierte Prozess stellt physiologischerweise die Verbindung zwischen der antigenunspezifischen, angeborenen Abwehr, die eine Art Frühwarnsystem bei der Pathogenerkennung darstellt, und der adaptiven Immunantwort her. Bei der klassischen Aktivierung von Komplement bindet das Plasmaprotein C1q an die Fc-Teile von IgG oder IgM, nachdem diese Antikörper an ihr Antigen spezifisch angedockt haben, oder direkt an die Oberflächenstrukturen der erkannten Pathogene (Tizard 1996, Janeway *et al.* 2005, Schütt and Bröker 2011). Alle drei Wege der Komplementaktivierung führen letztendlich zur Bildung des Membranangriffskomplexes (*membrane attack complex*, MAC), der aus den terminalen Komponenten der Komplementkaskade besteht. Polymerisierte C9-Moleküle führen letztendlich über Porenbildung in der Zellmembran zur osmotischen Lyse der betroffenen Zelle (Tizard 1996, Janeway *et al.* 2005, Schütt and Bröker 2011).

Bei der präzisen Quantifizierung der Komplement-vermittelten, zytotoxischen Aktivität der Rinderserumproben wurden hohe CD_{50}/ml -Werte in den Serumproben sowohl bei den PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern als auch bei den übrigen PregSure® BVD-geimpften Kühen ermittelt. Die CD_{50}/ml -Werte korrelierten in beiden Gruppen moderat mit den DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titern ($r = 0,61$ bzw. $0,70$) und zumindest in der erstgenannten Gruppe auch mit den DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Titern ($r = 0,71$). Die nur moderate Korrelation könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die von PregSure® BVD induzierten Allo-AK von Tier zu Tier in ihrer Fähigkeit unterscheiden, das Komplement zu aktivieren. Sollte sich diese These belegen lassen, dann wäre die Komplement-aktivierende Kapazität der induzierten Allo-AK eine weitere Variable, die neben den bereits bekannten bzw. vermuteten Einflussfaktoren (Höhe des Allo-AK-Titers im Serum, Spezifität der Allo-AK für verschiedene allele MHC-I-Varianten, Transferrate dieser Antikörper in das Kolostrum, aufgenommene Menge des Allo-AK-

haltigen Kolostrums, Resorptionsrate der Allo-AK aus dem Darm, MHC-I-Phänotyp des Kalbes), darüber mitentscheidet, wie umfangreich die verursachten Schäden im Kalb sind und ob es zur Ausprägung der BNP kommt.

Die Komplementfaktoren sind physiologischerweise in Serum enthalten, auch in Rinderserum (Mayr *et al.* 1977). Deshalb ist es verwunderlich, dass die Komplement-vermittelte Zytotoxizität der getesteten Rinderserumproben nicht bereits in den Testansätzen ohne dem artifiziellen Komplementzusatz erkennbar war, denn für den MTT-Test waren die Proben vorher prinzipiell nicht hitzebehandelt worden. Eine mögliche Erklärung ist die schon lange bekannte sog. antikomplementäre Wirkung von Rinderserum. Sie beruht vermutlich darauf, dass im Überschuss vorhandenes Globulin oder Lecithin einzelne Komplementfaktoren blockiert und die Komplementwirkung dadurch abschwächen oder sogar aufheben kann (Mayr *et al.* 1977). Eine andere Erklärung wäre, dass die Komplementaktivität infolge der Lagerung gelitten hatte. So waren die Serumproben der vorliegenden Untersuchung zum Zeitpunkt der Testdurchführung bereits über mehrere Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt worden. Pandey *et al.* (1993) hatten jedoch belegt, dass Serumproben von Rindern nach 245 Tagen Lagerung bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ca. 67 % ihrer Komplement-vermittelten hämolytischen Aktivität verlieren, während der Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ dagegen nur 15 bis 20 % (Pandey *et al.* 1993).

Ob die hier und in den zitierten Untersuchungen anderer Forscher im *in vitro*-Modell beobachtete Komplement-vermittelte Zytotoxizität der Allo-AK in der Pathogenese der BNP tatsächlich von Bedeutung ist, kann gegenwärtig noch nicht fundiert bewertet werden. Hierzu sind weitere, gezielte Untersuchungen erforderlich, insbesondere auch mit funktionsfähigem Rinderkomplement in Konzentrationen, wie sie im Rinderorganismus physiologisch sind. Die Komplement-vermittelte Zytotoxizität als Wirkmechanismus der Allo-AK würde immerhin gut die tierexperimentelle Beobachtung erklären, wonach die Zahlen von Lymphozyten und Thrombozyten bereits innerhalb weniger Stunden nach der oralen Aufnahme von BNP-assoziierten Allo-AK dramatisch abfallen (Friedrich *et al.* 2011, Schröter *et al.* 2011).

Zytophagozytose von BL-3-Zellen durch Makrophagen

In den Untersuchungen zur Zytophagozytose wurden BL-3-Zellen als Zielzellen der bovinen Makrophagen verwendet, da diese Zellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $9\text{--}12\text{ }\mu\text{m}$ (Theilen *et al.* 1968) in etwa die gleiche Größe wie Lymphozyten aufwiesen und als Suspensionszellen im Phagozytostest einfacher zu handhaben waren als die adhärenenten MDBK-Zellen. Die vorher erzielten Ergebnisse im

DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Test und deren gute Korrelation zu den Daten im DFZM-Allo-AK_{Lympho}-Test stellten zudem sicher, dass Allo-AK an die BL-3-Zellen in ähnlich hoher Menge banden wie an Lymphozyten. Die Methode zur Generierung von Makrophagen aus Blutmonozyten des Rindes gestaltete die Phagozytoseversuche zeit- und arbeitsintensiv. Meist war die Ausbeute an Makrophagen gering, sodass nur wenige Testreihen mit jeweils nur wenigen Ansätzen realisierbar waren. Deshalb ermöglichen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse nur eine Orientierung. Die statistische Prüfung der Daten auf signifikante Unterschiede war wegen der nur geringen Anzahl an getesteten Serumproben nicht möglich.

Das Ausmaß, mit dem die mit CFSE markierten und mit Allo-AK beladenen BL-3-Zellen von den Rindermakrophagen phagozytiert wurden, wurde nach 4 h und 18 h Inkubation bestimmt, um sowohl unmittelbar als auch verzögert einsetzende Effekte der Phagozytose zu erfassen. Als Anzeichen, dass BL-3-Zellen phagozytiert wurden, wurden eine Zunahme des Anteils CFSE-positiver Makrophagen im DFZM-Auswertfenster R1 und eine Abnahme der CFSE-positiven BL-3-Zellen im Auswertfenster R2 erwartet. Tatsächlich war in einer Versuchsreihe mit 4 h Inkubationszeit der Anteil CFSE-positiver Makrophagen größer, wenn die BL-3-Zellen mit zwei Allo-AK-haltigen Seren von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern präinkubiert worden waren. Der Anteil der CFSE-positiven BL-3-Zellen im Auswertfenster R2 blieb dabei nahezu unverändert. Nach 18-stündiger Inkubation mit einer Allo-AK-haltigen Serumprobe war dagegen der Anteil an CFSE-positiven BL-3-Zellen im Auswertfenster R2 um mehr als die Hälfte reduziert. Diese Ergebnisse könnten somit mit den von Bastian *et al.* (Bastian *et al.* 2011) publizierten Ergebnissen übereinstimmen und auf eine gesteigerte Phagozytose der mit Allo-AK markierten Zielzellen hindeuten. Damit könnte die BNP in ihrer Pathogenese einigen Immunerkrankungen des Menschen ähneln, bei denen ebenfalls Allo-AK bzw. Auto-AK ursächlich sind. So kommt es auch bei der FAIT/NAIT, der HDFN und den autoimmunen hämolytischen Anämien zur gesteigerten Phagozytose der durch die Antikörper opsonierten Zielzellen (Ahya *et al.* 2001, Berkowitz *et al.* 2006, Ghevaert *et al.* 2008).

Allerdings gab es neben den beschriebenen Ergebnissen weitere Versuchsansätze, in denen keine Veränderungen der Auswerteparameter bzw. keine Unterschiede zwischen Allo-AK-haltigen und Allo-AK-negativen Rinderseren festgestellt wurden. Eine mögliche Erklärung für die schlechte Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse ist, dass die Methodik des verwendeten Phagozytostests aufwändig und damit störanfällig war. Die verschiedenen Chargen an generierten Makrophagen können sich deshalb in ihrer Phagozytoseaktivität unterscheiden haben. Außerdem

waren tierindividuelle Unterschiede in der Phagozytoseaktivität zwischen den aus den Blutmonozyten verschiedener Spenderkühe stammenden Makrophagen nicht auszuschließen. Die Lokalisation im Gewebe bzw. Kulturbedingungen, insbesondere hinsichtlich der einwirkenden Zytokine und dem Lipid-/Cholesterolgehalt, haben bekanntlich einen maßgeblich Einfluss auf die Funktionsfähigkeit von Makrophagen (Stout *et al.* 2005, Williams *et al.* 2016), sodass geringfügige Veränderungen von Test zu Test deutliche Unterschiede in der Aktivität der verwendeten Zellen bedingt haben können.

Letztendlich liefern die erzielten Ergebnisse Hinweise auf zwei mögliche Wirkmechanismen der BNP-assoziierten Allo-AK im Rahmen der BNP-Pathogenese. Ob es im Kalb zur Komplement-vermittelten Lyse der Allo-AK-markierten Zellen kommt oder ob die Phagozytose der opsonierten Zellen *in vivo* eine größere Rolle spielt, bleibt zu klären. Die Studie von Bastian *et al.* (Bastian *et al.* 2011) und die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse zur Steigerung der Phagozytose durch die Allo-AK legen nahe, dass die Zytophagozytose an der für die BNP kennzeichnenden massiven Zelldepletion beteiligt ist. Sollte die Bindung der Allo-AK an die betroffenen Zellen auch *in vivo* zu einer Komplementaktivierung führen, dann könnte die Phagozytose dieser durch Allo-AK und Komplement sozusagen „doppelt“ opsonierten Zellen sowohl über die Fc-Gamma-Rezeptoren als auch über die Komplementrezeptoren der Phagozyten stattfinden und dadurch womöglich beschleunigt werden (Schütt and Bröker 2011).

5 Immunglobulin-Klasse und –subtyp der PregSure® BVD-assoziierten Alloantikörper

In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, mittels Durchflusszytometrie unter der Verwendung von MDBK-Zellen die Klassen- und IgG-Subklassenzugehörigkeit der Allo-AK des Rinderserums zu bestimmen. Da zur Herstellung des PregSure® BVD-Impfstoffes ebenfalls MDBK-Zellen oder zumindest diesen sehr ähnliche Zellen verwendet wurden (Bastian *et al.* 2011, Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011) müssten diese Zellen theoretisch das gesamte Spektrum an Allo-AK-Typen binden können. Beim Vergleich hinsichtlich ihres DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Titers unter der Verwendung von gegen IgG-, IgG₁-, IgG₂- und IgM-gerichteten Sekundärantikörpern wiesen die Serumproben der PregSure® BVD-geimpften Kühe mit allen verwendeten Sekundärantikörpern hoch signifikant höhere Titerwerte auf als die Kontrollserumproben. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl IgM als auch IgG₁ und IgG₂ zur Allo-AK-Reaktivität eines Serums beitragen. Da das Testsystem nicht darauf

ausgelegt war, den jeweiligen Massengehalt der Allo-AK einer Klasse/Subklasse zu ermitteln, waren die Werte nicht unmittelbar vergleichbar. Die höchsten Titerwerte wurden jedoch im IgG₁-DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test gemessen, wo auch der Unterschied zwischen den Titermittelwerten der Allo-AK-haltigen und der –negativen Serumproben mit einem Faktor von 11,3 am größten war.

Eine analoge Untersuchung von Kolostrumproben mit einem Immunfluoreszenztest hatte ergeben, dass es sich bei den BNP-assoziierten Allo-AK in Kolostrum ausschließlich um IgG₁-Antikörper handelt. Geringe IgG₂- und IgM-Signale auf den als Testzellen verwendeten bovinen Leukozyten wurden sowohl von den Kontrollproben als auch von den BNP-assoziierten Kolostrumproben erzeugt, was auf eine direkte Bindung des Sekundärantikörpers an IgM- und IgG₂-exprimierende B-Zellen angesehen und als unspezifische Bindung eingestuft wurde. An die Thrombozyten banden ausschließlich IgG₁-Alloantikörper (Assad *et al.* 2012).

Für den Gehalt an IgG in bovinem Kolostrum finden sich in der Literatur stark variierende Angaben. Es gilt aber als gesichert, dass IgG mit bis zu 90 % des Gesamtimmunoglobulingehaltes das Hauptimmunoglobulin in bovinem Kolostrum darstellt, und dass dieses kolostrale IgG nahezu ausschließlich dem Subtyp IgG₁ zuzuordnen ist. IgG₂, IgA und IgM sind im Vergleich dazu nur in kleinen Mengen in bovinem Kolostrum enthalten (Lascelles 1979, Larson *et al.* 1980, Newby *et al.* 1982, Butler 1983, Tizard 1996, Lipp 2005, Reinicke 2006). Deshalb kann man aus den Ergebnissen von Assad *et al.* (2012) und aus den vorliegenden Ergebnissen ableiten, dass den IgG₁-Allo-AK in der Pathogenese der BNP die größte Bedeutung zukommt. Allo-AK der Subklasse IgG₂ und der Klasse IgM scheinen aber durch die PregSure® BVD-Impfung ebenfalls induziert zu werden. Dass diese in Kolostrum nicht nachweisbar sind, spiegelt vermutlich wieder, dass der vorgeburtliche Transfer von Immunglobulinen aus dem Blut in das Milchdrüsensekret für IgG₁ am effektivsten ist (Larson *et al.* 1980, Salmon 1999).

6 MHC I-Spezifität der Alloantikörper

Wie inzwischen mehrere Arbeitsgruppen experimentell belegen konnten, sind MHC I-Moleküle auf den Zellen des Kalbes das vorrangige Ziel der mit PregSure® BVD bzw. BNP assoziierten Allo-AK (Deutskens *et al.* 2011, Foucras *et al.* 2011, Deutskens 2012, Kasonta *et al.* 2014, Bell *et al.* 2015, Benedictus *et al.* 2015). Um diese Bindungsspezifität auch bei den Allo-AK in den eigenen Rinderserumproben zu verifizieren, wurde versucht, die Bindung von zwei MHC I-spezifischen mono-

klonalen Antikörpern (IL-A88 bzw. W6/32) an MDBK-Zielzellen dadurch zu hemmen, dass diese zuerst mit Allo-AK-haltigen Serumproben inkubiert wurden. Bei diesen Versuchen, die ebenfalls mittels DFZM-Methodik ausgelesen wurden, waren die eingesetzten Serumproben aber nicht in der Lage, die Bindung der monoklonalen Antikörper an die MDBK-Zellen zu reduzieren. Die Ursache für dieses unerwartete Ergebnis konnte im Rahmen des Projektes nicht ermittelt werden. Denkbar ist, dass die Allo-AK andere Epitope im MHC I-Molekül erkennen als die monoklonalen Antikörper. Gegen diese Erklärung spricht allerdings, dass andere Autoren in einem ähnlichen Versuchsaufbau zumindest die Bindung des monoklonalen Antikörpers W6/32 an Leukozyten aus dem peripheren Blut eines geheilten BNP-Kalbs mit aufgereinigtem IgG aus gepoolten Seren von PregSure® BVD-geimpften BNP-Müttern inhibieren konnten. Sie schlussfolgerten konsequent, dass die BNP-assoziierten Allo-AK mit dem monoklonalen W6/32-Antikörper um dessen Epitop auf in den bovinen MHC-Molekülen konkurrierten (Foucras *et al.* 2011). Eine alternative Erklärung für die überraschenden und mit jener Publikation kontrastierenden Ergebnisse könnten methodische Unterschiede sein. Möglicherweise waren die eingesetzten Serumkonzentrationen zu gering, als dass die in ihnen vorhandenen Allo-AK mit den monoklonalen Antikörpern hätten konkurrieren können. (Foucras *et al.* 2011) gaben die von ihnen verwendeten Konzentrationen der Antikörper und Seren leider nicht an, sodass nicht geklärt werden konnte, ob hier der Grund für die Ergebnisunterschiede zu suchen war.

7 Schlussfolgerungen

- Mit den etablierten DFZM-Allo-AK-Tests können BNP- bzw. PregSure® BVD-assoziierte Allo-AK in den Serum- und Kolostrumproben von Rindern qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden.
- Neben den Blutleukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) und Thrombozyten aus dem Blut von gesunden Spenderkälbern eignen sich insbesondere auch Zellen der bovinen Zelllinien BL-3 und MDBK als Testantigen zum Nachweis dieser Allo-AK.
- BNP- bzw. PregSure® BVD-assoziierte Allo-AK fördern die lockere Agglutination boviner Testzellen. Der mit BL-3-Zellen etablierte SLA-Test ist deshalb eine technisch vergleichsweise einfache Testvariante, um derartige Allo-AK in Serumproben von Rindern semiquantitativ nachzuweisen.

- Mehrere Befunde stützen die Hypothese, dass der Impfstoff PregSure® BVD die Bildung von BNP-assoziierten Alloantikörpern induziert:
 - Es besteht ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen der Verwendung des Impfstoffes PregSure® BVD und dem Vorhandensein von Allo-AK gegen ein breites Spektrum an bovinen Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten, BL-3-Zellen und MDBK-Zellen) im Serum der geimpften Rinder.
 - Im Kolostrum von PregSure® BVD-geimpften Kühen sind ebenfalls Allo-AK nachweisbar.
 - Der Anteil an Allo-AK-positiven Rindern in PregSure® BVD-Impfbetrieben steigt mit dem Alter bzw. der Anzahl an verabreichten PregSure® BVD-Impfdosen an.
- Der Nachweis von Allo-AK im Kolostrum von PregSure® BVD-geimpften Kühen bestätigt die Theorie, dass BNP bei empfänglichen Kälbern erst durch die Aufnahme von Allo-AK mit dem Kolostrum ausgelöst wird.
- Der Befund, dass unter den PregSure® BVD-geimpften Kühen die BNP-Mütter im Durchschnitt höhere Allo-AK-Titer besitzen als die Nicht-BNP-Mütter, stützt nicht nur die Hypothese, dass BNP durch die Aufnahme von Allo-AK mit dem Kolostrum ausgelöst wird, sondern auch, dass dabei die Höhe des Allo-AK-Titers im mütterlichen Serum bzw. im Kolostrum ein wichtiger Faktor ist.
- Der statistisch gesicherte Zusammenhang zwischen der Verwendung des Bovidec®-Impfstoffes und dem Vorhandensein von Allo-AK gegen bovine Zellen lässt vermuten, dass man Allo-AK auch mit diesem Impfstoff induzieren kann. Dieser Impfstoff war bisher aber nicht mit BNP-Fällen in Zusammenhang zu bringen. Die gesundheitliche Bewertung der durch ihn induzierten Allo-AK bedarf der weiteren Erforschung.
- IgG₁-Allo-AK spielen in der Pathogenese der BNP die Hauptrolle. Die Impfung mit PregSure® BVD induziert bei den Rindern aber auch IgG₂- und IgM-Allo-AK.
- Die experimentellen Daten lassen noch keinen Schluss zu, über welche molekularen und zellulären Mechanismen die inkriminierten IgG₁-Allo-AK die für die BNP charakteristische Panzytopenie verursachen. Wahrscheinlich handelt es sich um ein multimechanistisches Geschehen, in dem der Komplement-vermittel-

ten Zytolyse sowie der Allo-AK-vermittelten Zytophagozytose größere Bedeutung zukommt als der direkten Induktion von Apoptose oder Nekrose.

- Die Hypothese, wonach die BNP- bzw. PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK gegen bovines MHC I gerichtet sind, konnte in DFZM-basierten kompetitiven Bindungsstudien mit monoklonalen Antikörpern an MDBK-Zellen nicht bestätigt werden.

VI Zusammenfassung

Die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine seit Ende 2006 beobachtete, oft tödliche verlaufende Krankheit bei neugeborenen Kälbern in Europa. Das klinische Bild der BNP ist geprägt von einer stark erhöhten Blutungsneigung, einer extremen Thrombozytopenie und Leukozytopenie sowie von einer massiven und in vielen Fällen irreversiblen Knochenmarksschädigung. Die Ursache der BNP war zunächst unbekannt. Zu Beginn der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen deuteten erste experimentelle Daten darauf hin, dass BNP eine immunpathologische Erkrankung ist, bei der impfinduzierte maternale Allo-AK, die von empfänglichen Kälbern mit dem Kolostrum aufgenommen werden, ursächlich sind.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren deshalb, den epidemiologischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von BNP-Fällen und von Allo-AK bei Rindern näher zu beleuchten und die nachgewiesenen Allo-AK, vor allem bezüglich ihrer Wirkung auf die Zielzellen, näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde auf Basis des von Bridger *et al.* (2011) entwickelten Tests eine Durchflusszytometrie-Methode (DFZM-Allo-AK-Test) etabliert, mit dem Allo-AK in Serum- und Kolostrumproben von Rindern unter Verwendung verschiedener Testzellen sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisbar sind. Als Testzellen wurden Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten aus dem Blut gesunder Spenderkälber sowie Zellen der bovinen Linien BL-3 und MDBK verwendet. Für die serologischen Untersuchungen standen Serum- und Kolostrumproben ($n = 166$ bzw. $n = 13$) von weiblichen Rindern aus zwei PregSure® BVD-Impfbetrieben sowie Serumproben aus einem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb ($n = 50$) und einem Bovidex®-Impfbetrieb ($n = 50$) zur Verfügung. Als Kontrollproben dienten Serum- und Kolostrumproben ($n = 50$ bzw. $n = 3$) aus zwei Betrieben, in denen nicht gegen BVDV geimpft wurde und welche im Sinne der BVDV-Verordnung als BVD-unverdächtig galten (Kontrollbetriebe). Einige Serum- ($n = 27$) und Kolostrumproben ($n = 7$) aus den PregSure® BVD-Impfbetrieben stammten von Kühen, die wenigstens einmal ein Kalb geboren hatten, das später an BNP erkrankt war (BNP-Mütter). Zur Bestimmung der Immunglobulinklasse und des IgG-Subtyps der Allo-AK wurde der DFZM-Allo-AK_{MDBK}-Test unter Verwendung entsprechender kommerzieller Sekundärantikörper eingesetzt. Die Prüfung der Rinderseren auf ihre zytotoxische Wirkung erfolgte mit dem MTT-Test an MDBK-Zellen, ihre Apoptose- und Nekrose-induzierende Aktivität wurde DFZM-basiert mit dem *Annexin V-FITC Assay Kit* (Fa. AbD Serotec) analysiert. In einem DFZM-basierten Phagozytose-Test wurde

geprüft, ob Allo-AK-haltige Rinderseren die Zytophagozytose von BL-3-Zellen durch bovine Makrophagen *in vitro* zu stimulieren vermögen.

An den 166 Serumproben aus den zwei PregSure® BVD-Impfbetrieben wurde ersichtlich, dass die in den verschiedenen DFZM-Test-Formaten erzielten Messwerte für Allo-AK gut miteinander korrelierten (Korrelationskoeffizient r von 0,70 bis 0,95). Da die Allo-AK-haltigen Seren BL-3-Zellen agglutinierten, wurde ein Serum-Langsam-Agglutinationstest (SLA) etabliert, dessen Messwerte mit denen des DFZM-Allo-AK_{BL-3}-Tests gut korrelierten ($r = 0,89$).

Im DFZM-Allo-AK_{Leuko}- und DFZM-Allo-AK_{Thrombo}-Test wiesen die Kühe der beiden PregSure® BVD-Impfbetriebe, unabhängig von der verwendeten Testzelle, im Mittel hoch signifikant höhere Allo-AK-Titer auf, als Rinder in dem Bovilis® BVD-MD- und dem Bovidex®-Impfbetrieb sowie in den beiden Kontrollbetrieben ($p \leq 0,001$). Auch mit den beiden Zelllinien BL-3-Zellen und MDBK-Zellen zeigten die Kühe aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben im Durchschnitt hoch signifikant ($p \leq 0,001$) bzw. signifikant ($p \leq 0,01$) höhere Allo-AK-Titer als die Kühe aus den anderen Betrieben.

Unter den mit PregSure® BVD geimpften Kühen waren bei den BNP-Müttern im Durchschnitt hoch signifikant höhere Allo-AK-Titer nachweisbar als bei den Nicht-BNP-Müttern ($p \leq 0,001$). In den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben stieg der Anteil Allo-AK-positiver weiblicher Rinder pro Altersgruppe von den zweijährigen bis zu den fünfjährigen Rindern stetig an (von 10 % in Betrieb A bzw. 22 % in Betrieb B auf 100 % in beiden Betrieben). Auch in den Kolostrumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen ($n = 13$) waren BNP-assoziierte Allo-AK nachweisbar, wobei der Allo-AK-Titer im Kolostrum im Mittel 1,35-mal so hoch war wie der Titer in der korrespondierenden Serumprobe. Bei den Kühen aus dem Bovidex®-Impfbetrieb konnten ebenfalls Allo-AK in Serumproben nachgewiesen werden. Im Mittel waren diese Allo-AK-Titer aber je nach verwendetem Testzelltyp hoch signifikant ($p \leq 0,001$) bzw. signifikant ($p \leq 0,01$) niedriger als bei den mit PregSure® BVD-geimpften Rindern.

Im Gegensatz zu Allo-AK-negativen Serumproben reduzierten Allo-AK-haltige Proben die Vitalität von MDBK um durchschnittlich 67,6 % ($p < 0,001$). Der zytotoxische Effekt trat aber nur dann ein, wenn die Testansätze mit Meer-schweinchenkomplement supplementiert wurden. Ein direkter zytotoxischer Effekt der Allo-AK-haltigen Serumproben auf MDBK-Zellen war ebensowenig nachweisbar, wie eine direkte, Apoptose- oder Nekrose-induzierende Aktivität. Der Phagozytose-Test war methodisch aufwändig und lieferte inkonsistente Resultate. In einigen Versuchs-ansätzen wurde beobachtet, dass die Präinkubation von BL-3-Zellen mit Allo-AK-

haltigen Seren deren nachfolgende Ingestion durch Makrophagen förderte. In DFZM-basierten kompetitiven Bindungsstudien konnten die Allo-AK-haltigen Serumproben die Bindung der MHC I-spezifischen, monoklonalen Antikörper IL-A88 und W6/32 an MDBK-Zellen nicht verhindern.

Allo-AK waren in beiden untersuchten Immunglobulinklassen (IgG und IgM) sowie bei beiden geprüften IgG-Subtypen (IgG₁ und IgG₂) nachweisbar. Die Titer-Unterschiede zwischen Allo-AK-haltigen und Allo-AK-negativen Rinderserumproben waren für IgG₁ am größten, was den Schluss zuließ, dass IgG₁-Allo-AK den Großteil der Alloreaktivität in den Serumproben der PregSure® BVD-geimpften Rinder ausmacht.

Insgesamt betrachtet, stützt der statistisch zu sichernde Zusammenhang zwischen der Verwendung des Impfstoffes PregSure® BVD und dem Vorhandensein von Allo-AK gegen ein breites Spektrum an bovinen Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten, BL-3-Zellen und MDBK-Zellen) im Serum der geimpften Rinder die Hypothese, dass dieser Impfstoff für die Induktion solcher Antikörper entscheidend ist. Weiterhin bestätigt der Nachweis von Allo-AK im Kolostrum von PregSure® BVD-geimpften Kühen die Theorie, dass BNP bei empfänglichen Kälbern erst durch die Aufnahme von Allo-AK mit dem Kolostrum ausgelöst wird. Die in dieser Arbeit erhobenen experimentellen Daten lassen noch keinen Schluss zu, über welche molekularen und zellulären Mechanismen die Allo-AK die für die BNP charakteristischen Panzytopenie verursachen. Wahrscheinlich handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, in dem der Komplement-vermittelten Zytolyse sowie der Allo-AK-vermittelten Zytophagozytose größere Bedeutung zukommt als der direkten Induktion von Apoptose oder Nekrose.

VII Summary

Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) has emerged since the end of 2006 as a new life-threatening disease affecting neonatal calves in Europe. The clinical picture is characterized by increased susceptibility to bleeding, extreme thrombocytopenia and leucopenia and severe bone marrow damage which in many cases is irreversible. The etiology of BNP was unknown at first. At the time when the investigations described in this work were started symptoms, cytological, pathological and histological findings gave rise to the assumption that an immune-mediated mechanism including maternal alloantibodies (allo-Abs) was involved in the pathogenesis of BNP.

Therefore, the aim of this study was to further elucidate the epidemiological link between cases of BNP and the presence of allo-Abs in female bovines and to characterize the features of the allo-Abs in more detail especially concerning their effect on the target cells. For this purpose the flow cytometry (FC) assay (FC-allo-Ab-assay) as published by Bridger *et al.* (2011) was developed further in order to assess allo-Abs in bovine serum and colostrum samples qualitatively and quantitatively by using different cells as test antigens. Lymphocytes, monocytes, granulocytes and thrombocytes isolated from the blood of healthy donor calves as well as the bovine cell lines BL-3 cells and MDBK cells were used as test cells. Serum and colostrum samples, respectively (n = 166, n = 13), from two PregSure® BVD-vaccinated herds as well as serum samples from a Bovilis® BVD-MD-vaccinated herd (n = 50) and a Bovidec®-vaccinated herd (n = 50) were available for testing in the different FC-allo-Ab-assay formats. Serum and colostrum samples (n = 50, n = 3) from two herds unsuspecting of BVDV and without vaccination history against BVDV served as controls (control herds). Some of the samples from the PregSure® BVD-vaccinated herds (27 serum samples, 7 colostrum samples) originated from cows which had given birth to at least one calf suffering from BNP (BNP mothers). In order to determine the immunoglobulin class and subtype of the allo-Abs we used the FC-allo-Ab_{MDBK}-assay applying different commercially available secondary antibodies. Possible cytotoxic effects of the bovine serum samples were tested in the cytotoxicity assay (MTT assay) using MDBK cells. The capability of allo-Abs to induce apoptosis and/or necrosis was analysed by flow cytometry using the *Annexin V-FITC Assay Kit* (Fa. AbD Serotec). In a FC-based phagocytosis assay the capability of allo-Ab-positive bovine sera to stimulate cytophagocytosis of BL-3 cells by bovine macrophages *in vitro* was investigated.

Assessment of the 166 serum samples originating from the two PregSure® BVD-vaccinated herds revealed that data of the different FC-allo-Ab-assay formats correlated well with each other (correlation coefficient r ranging from 0.70 to 0.95). Based on the observation that allo-Ab-containing sera were able to agglutinate BL-3 cells a serum-slow-agglutination assay (SLA assay) was established as well. The values elaborated using this SLA assay correlated well with the results obtained in the FC-allo-Ab_{BL-3}-assay ($r = 0.89$).

Applying the FC-allo-Ab_{Leuco}- and the FC-allo-Ab_{Thrombo}-assay to sera obtained from cows in the PregSure® BVD-vaccinated herds yielded significantly higher allo-Ab-titers than with sera from cows in the Bovilis® BVD-MD- and Bovidec®-vaccinated herds or from cows in the control herds ($p \leq 0.001$). Using BL-3 and MDBK cells as test cells the cows from the PregSure® BVD-vaccinated herds also showed highly significantly ($p \leq 0.001$) or significantly ($p \leq 0.01$) higher allo-Ab-titers compared to the cows from the other herds.

Among PregSure® BVD-vaccinated cows BNP-mothers displayed significantly higher allo-Ab-titers than the non-BNP-mothers ($p \leq 0.001$). Furthermore, the percentage of allo-Ab-positive bovines increased continuously in the PregSure® BVD-vaccinated herds from the two year cohort to the five year cohort (from 10 % in herd A and 22 % in herd B up to 100 % in each herd). Colostrum samples collected from PregSure® BVD-vaccinated cows ($n = 13$) contained allo-Abs as well. On average the colostrum allo-Ab-titer was 1.35-times as high as the titer of the corresponding serum sample.

In addition to PregSure® BVD-vaccinated bovines some cows in the Bovidec®-vaccinated herd also harbored allo-Abs in their blood. However, mean allo-Ab-titers of Bovidec®-vaccinated cows were highly significantly or significantly lower than mean titers of PregSure® BVD-vaccinated cows, respectively.

Allo-Ab-positive serum samples reduced vitality of MDBK cells on average by about 67.6 % ($p < 0.001$) in contrast to the allo-Ab-negative sera. However, this cytotoxic effect of allo-Abs was only detectable when reaction mixtures were supplemented with guinea pig complement. Serum samples did neither have a direct cytotoxic effect on MDBK cells nor induced apoptosis or necrosis. The phagocytosis assay was laborious and provided inconsistent results, unfortunately. Nevertheless, in some of the experiments allo-Ab-positive sera promoted *in vitro* phagocytosis of BL-3 cells by macrophages derived from the blood of bovine donors. In a FC-based

competitive binding experiment allo-Ab-containing sera failed to inhibit MHC I-specific monoclonal antibodies IL-A88 and W6/32 from binding to MDBK cells.

PregSure® BVD-associated allo-Abs belonged to classes IgG and IgM and subtypes IgG₁ and IgG₂. The biggest differences in titers between allo-Ab-positive and allo-Ab-negative serum samples were demonstrated for IgG₁.

Taken together the significant association between the application of PregSure® BVD and the presence of allo-Abs against a broad spectrum of bovine cells (lymphocytes, monocytes, granulocytes, platelets, BL-3 cells, and MDBK cells) in sera of female bovines strongly supports the hypothesis that this vaccine is responsible for the induction of BNP-associated allo-Abs. It was concluded that IgG₁-allo-Abs bear the majority of alloreactivity in sera of PregSure® BVD-vaccinated cattle. Furthermore detection of alloreactivity in colostrum samples collected from PregSure® BVD-vaccinated cows suggests that uptake of allo-Abs via colostrum triggers the pathogenesis of BNP in susceptible calves. However, it remained largely unknown by which molecular or cellular mechanism allo-Abs cause pancytopenia in BNP. From experimental data of this investigation it appears likely that complement-mediated cytolysis and allo-Ab-mediated cytophagocytosis are more important than direct induction of apoptosis or necrosis in target cells.

VIII Literaturverzeichnis

- Ahya, R., M. L. Turner and S. J. Urbaniak (2001). "Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia." *Transfus Apher Sci* 25 (2): 139-145.
- Albayrak, H., E. Ozan and S. Gur (2010). "A serologic investigation of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in cattle and gazella subgutturosa subgutturosa in Turkey." *Trop Anim Health Prod* 42 (8): 1589-1591.
- Alonso-Amelot, M. E., U. Castillo, B. L. Smith and D. R. Lauren (1996). "Bracken ptaquiloside in milk." *Nature* 382 (6592): 587.
- Ammann, V. J., G. Fecteau, P. Helie, M. Desnoyer, P. Hebert and M. Babkine (1996). "Pancytopenia associated with bone marrow aplasia in a Holstein heifer." *Can Vet J* 37 (8): 493-495.
- Amrhein, J. and H. Bostedt (2003). "Immunthrombozytopenie bei neugeborenen Ferkeln." *Tierärztl Prax (G)* 31 260-263.
- Anonym (1941). "Cause of Sweet Clover Poisoning." *Can J Comp Med Vet Sci* 5 (10): 293.
- Anonym (2004). Next generation adjuvant system: Key to enhanced protection conferred by BVDV (Type 1 and 2) components of CattleMaster GOLD. Pfizer.
- Anonym (2009a). Abstracts "Hemorrhagic Diathesis in Calves". Proceedings of the Satellite Symposium "Hemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille, Société Française de Buéatrie.
- Anonym (2009b). Scientific Opinion on Epizootic Hemorrhagic Disease. EFSA Journal, European Food Safety Authority.
- Anonym (2009c). Fachinformation in Form der Zusammenfassung der Merkmale des Tierarzneimittels PregSure® BVD (Summary of Product Characteristics). Pfizer: 1-6.
- Anonym (2010a). Pressemitteilung: Pfizer Tiergesundheit setzt Verkauf von BVD-Impfstoff in Deutschland vorerst aus, Pfizer.
- Anonym (2010b). Opinion following an Article 78 procedure for Pregsure BVD and associated names (Annex II Scientific conclusions and grounds for suspension of the marketing authorisations), European Medicines Agency.
- Anonym (2011a). Aktuelle Informationen zum Impfstoff PregSure BVD. Retrieved 06.09.2011, from http://www.pei.de/nn_162662/DE/infos/tieraerzte/pharm-vet/uaw-vet/bnp/110831-bnp-ruecknahme-zulassung.html?nn=true.
- Anonym (2011b). Ausschuss für Tierarzneimittel der Europäischen Arzneimittelagentur folgt Antrag des Paul-Ehrlich-Instituts wegen des "Blutschwitzens der Kälber". Retrieved 01.06.2010, from http://www.pei.de/cln_092/nn_1686480/DE/infos/tieraerzte/pharm-vet/uaw-vet/bnp/bnp-cvmp.html.

- Anonym (2011c). Information zum Impfstoff PregSure BVD: Erlöschen der Zulassung und weitere Forschungsergebnisse. from <http://www.pei.de/DE/arzneimittelsicherheit-vigilanz/veterinaermedizin-pharmakovigilanz/sicherheitsinformationen-veterinaermedizin/2011-2003-vet/ablage2011-2003/2011-08-31-bnp-ruecknahme-zulassung.html?nn=3257194>.
- Anonym (2012a). Qualitative Risikobewertung zum Risiko des Wiederauftretens der Blauzungenkrankheit in Deutschland. Friedrich-Loeffler-Institut. Retrieved 04.04.2012.
- Anonym (2012b). Human Fetal Links with Some Vaccines. National Network for Immunization Information (NNii). Retrieved 09.07.2012.
- Anonym (2013). Classification of purified anti-human HLA-A, B, C Antibody. BioLegend. BioLegend Inc., San Diego, USA.
- Anonym (2014). Steckbrief Blauzungenkrankheit. Friedrich-Loeffler-Institut. Retrieved 01.01.2015.
- Anonym (2014). Verordnung der anzeigepflichtigen Tierseuchen. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft.
- Anonym (2016). Annex II Scientific conclusions and grounds for the granting of the marketing authorisations: Overall summary of the scientific evaluation of CattleMarker IBR Inactivated. European Medicine Agency.
- Anonym (2017). Table of blood group systems. http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Table_of_blood_group_systems_v5.0_170205.pdf.
- Anonym (a). Chloramphenicol. Retrieved 02.07.2013, from <http://www.vetidata.de>.
- Anonym (b). Furazolidon. Retrieved 02.07.2013, from <http://www.vetidata.de>.
- Armengol, R., D. Ponté, A. de Prado, M. Sierra, M. Casa, M. de las Heras, A. Uixera and J. García-Jalón (2010). "Síndrome dela diátesis hemorrágica del ternero (pancitopenia neonatal bovina) en Espana." Boletín de anembe 85: 28-31.
- Arnold, B. M. (2006). Epidemiologische Untersuchungen zur Häufigkeit verschiedener Blutgruppenfaktoren beim Shire Horse in Großbritannien und Deutschland unter besonderer Berücksichtigung der neonatalen Isoerythrolyse. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Assad, A., B. Amann, A. Friedrich and C. A. Deeg (2012). "Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages." Vet Immunol Immunopathol 147 (1-2): 25-34.
- Ault, K. A. (1993). "Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets." Ann N Y Acad Sci 677: 293-308.
- Baiochi, E. and L. M. Nardozza (2009). "[Alloimmunization]." Rev Bras Ginecol Obstet 31 (6): 311-319.

- Ballingall, K. T. (2011a). "Genes and the development of bovine neonatal pancytopenia." *Vet J* 190 (2): 187-188.
- Ballingall, K. T., M. Nath, A. Holliman, E. Laming, P. Steele and K. Willoughby (2011b). "Lack of evidence for an association between MHC diversity and the development of bovine neonatal pancytopenia in Holstein dairy cattle." *Vet Immunol Immunopathol* 141 (1-2): 128-132.
- Bastian, M., M. Holsteg, H. Hanke-Robinson, K. Duchow and K. Cussler (2011). "Bovine Neonatal Pancytopenia: Is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies?" *Vaccine* 29: 5267-5275.
- Basu, S., R. Kaur and G. Kaur (2011). "Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives." *Asian J Transfus Sci* 5 (1): 3-7.
- Bauer, N., L. Wenzel, A. Moritz and K. Doll (2009). Entwicklung der Blutbild- und Knochenmarksbefunde bei Kälbern mit Hämorrhagischer Diathese. 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, Berlin, Vortragszusammenfassungen.
- Bell, C. (2011). "Bovine Neonatal Pancytopenia or bleeding calf syndrome." *Livestock* 16 (1): 24-28.
- Bell, C. R., M. G. Kerr, P. R. Scott, W. I. Morrison and H. Brown (2014). "Evidence of a high incidence of subclinically affected calves in a herd of cattle with fatal cases of Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP)." *BMC Vet Res* 10: 245.
- Bell, C. R., N. D. MacHugh, T. K. Connelley, K. Degnan and W. I. Morrison (2015). "Haematopoietic depletion in vaccine-induced neonatal pancytopenia depends on both the titre and specificity of alloantibody and levels of MHC I expression." *Vaccine* 33 (30): 3488-3496.
- Bell, C. R., P. R. Scott, M. G. Kerr and K. Willoughby (2010a). "Possible preventive strategy for bovine neonatal pancytopenia." *Vet Rec* 167 (19): 758.
- Bell, C. R., P. R. Scott and C. D. Penny (2009a). Ten cases of "Bleeding Calf Syndrome" in a scottish beef herd: Epidemiology. *European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves Marseille*.
- Bell, C. R., P. R. Scott and C. D. Penny (2009b). Ten cases of "Bleeding Calf Syndrome" in a Scottish beef herd: Investigations into pathogenesis and aetiology. *European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves, Marseille*.
- Bell, C. R., P. R. Scott and C. D. Penny (2009c). Ten cases of "Bleeding Calf Syndrome" in a Scottish beef herd: Clinical signs, haematology and attempted treatment. *European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves, Marseille*.
- Bell, C. R., P. R. Scott, N. D. Sargison, D. J. Wilson, L. Morrison, F. Howie, K. Willoughby and C. D. Penny (2010b). "Idiopathic bovine neonatal pancytopenia in a Scottish beef herd." *Vet Rec* 167 (24): 938-940.

- Benedictus, L. and C. R. Bell (2017). "The risks of using allogeneic cell lines for vaccine production: the example of Bovine Neonatal Pancytopenia." *Expert Rev Vaccines* 16 (1): 65-71.
- Benedictus, L., R. D. Luteijn, H. Otten, R. J. Lebbink, P. J. van Kooten, E. J. Wiertz, V. P. Rutten and A. P. Koets (2015). "Pathogenicity of Bovine Neonatal Pancytopenia-associated vaccine-induced alloantibodies correlates with Major Histocompatibility Complex class I expression." *Sci Rep* 5: 12748.
- Benedictus, L., H. G. Otten, G. van Schaik, W. G. van Ginkel, H. C. Heuven, M. Nielen, V. P. Rutten and A. P. Koets (2014). "Bovine Neonatal Pancytopenia is a heritable trait of the dam rather than the calf and correlates with the magnitude of vaccine induced maternal alloantibodies not the MHC haplotype." *Vet Res* 45: 129.
- Benedictus, L., V. P. Rutten and A. P. Koets (2016). "Pregnancy boosts vaccine-induced Bovine Neonatal Pancytopenia-associated alloantibodies." *Vaccine* 34 (8): 1002-1005.
- Berkowitz, R. L., J. B. Bussel and J. G. McFarland (2006). "Alloimmune thrombocytopenia: state of the art 2006." *Am J Obstet Gynecol* 195 (4): 907-913.
- Bianchi, D. W., A. F. Flint, M. F. Pizzimenti, J. H. Knoll and S. A. Latt (1990). "Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (9): 3279-3283.
- Bolin, S. R. and J. F. Ridpath (1992). "Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves." *Am J Vet Res* 53 (11): 2157-2163.
- Boyle, A. G., K. G. Magdesian and R. E. Ruby (2005). "Neonatal isoerythrolysis in horse foals and a mule foal: 18 cases (1988-2003)." *J Am Vet Med Assoc* 227 (8): 1276-1283.
- Bridger, P. S., R. Bauerfeind, L. Wenzel, N. Bauer, C. Menge, H. J. Thiel, M. Reinacher and K. Doll (2011). "Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia." *Vet Immunol Immunopathol* 141 (1-2): 1-10.
- Brodie, S. J., K. D. Bardsley, K. Diem, J. O. Mecham, S. E. Norelius and W. C. Wilson (1998). "Epizootic hemorrhagic disease: analysis of tissues by amplification and in situ hybridization reveals widespread orbivirus infection at low copy numbers." *J Virol* 72 (5): 3863-3871.
- Brown, G., P. Biberfeld, B. Christensson and D. Y. Mason (1979). "The distribution of HLA on human lymphoid, bone marrow and peripheral blood cells." *Eur J Immunol* 9 (4): 272-275.
- Buck, B. C., R. Ulrich, H. Kuiper, M. Reinacher, M. Peters, P. Heimberg, M. Holsteg, C. Puff, L. Haas, M. Ganter and O. Distl (2011). "[Bovine neonatal pancytopenia in German Holstein calves]." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124 (7-8): 329-336.

- Buechner-Maxwell, V., M. A. Scott, L. Godber and A. Kristensen (1997). "Neonatal alloimmune thrombocytopenia in a quarter horse foal." *J Vet Intern Med* 11 (5): 304-308.
- Burke, J. and K. Johansen (1974). "The formation of HL-A antibodies in pregnancy. The antigenicity of aborted and term fetuses." *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 81 (3): 222-228.
- Butler, J. E. (1983). "Bovine immunoglobulins: an augmented review." *Vet Immunol Immunopathol* 4 (1-2): 43-152.
- Bux, J., K. D. Jung, T. Kauth and C. Mueller-Eckhardt (1992). "Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia." *Transfus Med* 2 (2): 143-149.
- Caldwell, J., C. F. Bryan, P. A. Cumberland and D. F. Weseli (1977). "Serologically detected lymphocyte antigens in Holstein cattle." *Anim Blood Groups Biochem Genet* 8 (4): 197-207.
- Cedillo Rosales, S. (2004). Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Chen, P., C. Li, S. Lang, G. Zhu, A. Reheman, C. M. Spring, J. Freedman and H. Ni (2010). "Animal model of fetal and neonatal immune thrombocytopenia: role of neonatal Fc receptor in the pathogenesis and therapy." *Blood* 116 (18): 3660-3668.
- Chou, S. C., P. M. Flood and J. A. Raleigh (1996). "Marking hypoxic cells for complement and cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis: using pimonidazole." *Br J Cancer Suppl* 27: S213-216.
- Clatworthy, M. R., M. Espeli, N. Torpey and K. G. Smith (2010). "The generation and maintenance of serum alloantibody." *Curr Opin Immunol* 22 (5): 669-681.
- Clawson, M. L., M. P. Heaton, C. G. Chitko-McKown, J. M. Fox, T. P. Smith, W. M. Snelling, J. W. Keele and W. W. Laegreid (2004). "Beta-2-microglobulin haplotypes in U.S. beef cattle and association with failure of passive transfer in newborn calves." *Mamm Genome* 15 (3): 227-236.
- Clover, C. K. and A. Zarkower (1980). "Immunologic responses in colostrum-fed and colostrum-deprived calves." *Am J Vet Res* 41 (7): 1002-1007.
- Corapi, W. V., T. W. French and E. J. Dubovi (1989). "Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus." *J Virol* 63 (9): 3934-3943.
- Corbière, F., G. Foucras, C. Lacroux, G. Meyer and F. Schelcher (2009). Haemorrhagic Diathesis Syndrome: Clinical and epidemiological findings of 48 suspected cases in France, 2007-2009. European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves, Marseille.
- Curtis, B. R., C. Reno and R. H. Aster (2005). "Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil

- alloantigen HNA-1c (SH): a report of five cases." *Transfusion* 45 (8): 1308-1313.
- Cußler, K. (2011). "Aktuelles zur Bovinen Neonatalen Panzytopenie." *Deutsches Tierärzteblatt* 59 (6): 746/747.
- de Graaf-Roelfsema, E., J. H. van der Kolk, S. Boerma and H. van Haeringen (2007). "Non-specific haemolytic alloantibody causing equine neonatal isoerythrolysis." *Vet Rec* 161 (6): 202-204.
- Dean, H. J. and R. Leyh (1999). "Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge." *Vaccine* 17 (9-10): 1117-1124.
- Demana, P. H., C. Fehske, K. White, T. Rades and S. Hook (2004). "Effect of incorporation of the adjuvant Quil A on structure and immune stimulatory capacity of liposomes." *Immunol Cell Biol* 82 (5): 547-554.
- Demasius, W., R. Weikard, F. Hadlich, K. E. Muller and C. Kuhn (2013). "Monitoring the immune response to vaccination with an inactivated vaccine associated to bovine neonatal pancytopenia by deep sequencing transcriptome analysis in cattle." *Vet Res* 44: 93.
- Demasius, W., R. Weikard, A. Kromik, C. Wolf, K. Muller and C. Kuhn (2014). "Bovine neonatal pancytopenia (BNP): novel insights into the incidence, vaccination-associated epidemiological factors and a potential genetic predisposition for clinical and subclinical cases." *Res Vet Sci* 96 (3): 537-542.
- Dennis, R. A., P. J. O'Hara, M. F. Young and K. D. Dorris (1970). "Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves." *J Am Vet Med Assoc* 156 (12): 1861-1869.
- Deutskens, F. (2012). Untersuchungen zur Ätiologie der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP). Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Deutskens, F., B. Lamp, C. M. Riedel, E. Wentz, G. Lochnit, K. Doll, H. J. Thiel and T. Rumenapf (2011). "Vaccine-induced antibodies linked to Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) recognize cattle Major Histocompatibility Complex class I (MHC I)." *Vet Res* 42 (1): 97.
- Diao, J., N. D. Churchill and T. I. Michalak (1998). "Complement-mediated cytotoxicity and inhibition of ligand binding to hepatocytes by woodchuck hepatitis virus-induced autoantibodies to asialoglycoprotein receptor." *Hepatology* 27 (6): 1623-1631.
- Dimmock, C. K. and K. Bell (1970). "Haemolytic disease of the newborn in calves." *Aust Vet J* 46 (2): 44-47.
- Doll, K., L. Wenzel, M. König, H.-J. Thiel, M. Reinacher, E. Prenger-Berninghoff, R. Weiß, A. Moritz and N. Bauer (2009). Krankheitsverlauf bei Kälbern mit Hämorrhagischer Diathese. 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, Berlin, Vortragszusammenfassungen.
- Dowsett, K. F., C. K. Dimmock and M. W. Hill (1978). "Haemolytic disease in new born calves." *Aust Vet J* 54 (2): 65-67.

- Duffy, J. H. and P. M. Outteridge (1985). "Studies on the bovine lymphocyte antigens and the production of lymphocytotoxic antibodies by parous cattle." *Anim Blood Groups Biochem Genet* 16 (2): 85-92.
- Eckstein, R. (2001a). *Klinische Immunhämатologie: Der Morbus haemolyticus neonatorum. Immunhämатologie und Transfusionsmedizin. München und Jena, Urban & Fischer Verlag.* 4: 180-190.
- Eckstein, R. (2001b). *Immunhämатologie. Immunhämатologie und Transfusionsmedizin. München und Jena, Urban & Fischer Verlag.*
- Eckstein, R. (2001c). *Klinische Immunhämатologie: Die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie; Die fetale/neonatale Alloimmungranulozytopenie. Immunhämатologie und Transfusionsmedizin. München und Jena, Urban & Fischer Verlag.* 4: 191-192.
- Eder, A. F. (2006). "Update on HDFN: new information on long-standing controversies." *Immunohematology* 22 (4): 188-195.
- Ellis, J., K. West, V. Cortese, C. Konoby and D. Weigel (2001). "Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhea virus type II in young calves." *J Am Vet Med Assoc* 219 (3): 351-356.
- Euler, K. N., S. M. Hauck, M. Ueffing and C. A. Deeg (2013). "Bovine neonatal pancytopenia--comparative proteomic characterization of two BVD vaccines and the producer cell surface proteome (MDBK)." *BMC Vet Res* 9: 18.
- Filbey, D., U. Hanson and G. Wesstrom (1995). "The prevalence of red cell antibodies in pregnancy correlated to the outcome of the newborn: a 12 year study in central Sweden." *Acta Obstet Gynecol Scand* 74 (9): 687-692.
- Fleming, K. A., A. McMichael, J. A. Morton, J. Woods and J. O. McGee (1981). "Distribution of HLA class 1 antigens in normal human tissue and in mammary cancer." *J Clin Pathol* 34 (7): 779-784.
- Ford, C. H. J. and M. W. Elves (1974). "The production of cytotoxic antileucocyte antibodies by parous sheep." *Journal of Immunogenetics* 1: 259-264.
- Forster, L. M. (2007). "Neonatal alloimmune thrombocytopenia, purpura, and anemia in 6 neonatal piglets." *Can Vet J* 48 (8): 855-857.
- Foucras, G., F. Corbiere, C. Tasca, C. Pichereaux, C. Caubet, C. Trumel, C. Lacroux, C. Franchi, O. Burlet-Schiltz and F. Schelcher (2011). "Alloantibodies against MHC Class I: A Novel Mechanism of Neonatal Pancytopenia Linked to Vaccination." *J Immunol* 187 (12): 6564-6570.
- Fox, L. E., S. Ford, A. R. Alleman, B. L. Homer and J. W. Harvey (1993). "Aplastic anemia associated with prolonged high-dose trimethoprim-sulfadiazine administration in two dogs." *Vet Clin Pathol* 22 (3): 89-92.
- Friedrich, A., A. Assad, A. Carlin, C. Sauter-Louis, G. Rademacher and W. Klee (2009c). Disorders of differential diagnostic interest. European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves, Marseille.

- Friedrich, A., M. Büttner, G. Rademacher, W. Klee, B. K. Weber, M. Müller, A. Carlin, A. Assad, A. Hafner-Marx and C. M. Sauter-Louis (2011). "Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves." *BMC Vet Res* 7: 10.
- Friedrich, A., A. Carlin, A. Assad, M. Büttner, G. Rademacher, C. Sauter-Louis and W. Klee (2009d). Experimental production of the syndrome. European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves Marseille.
- Friedrich, A., A. Carlin, A. Assad, C. Sauter-Louis, G. Rademacher and W. Klee (2009e). Increase in the incidence of a bleeding disorder in young calves: Epidemiological data from Germany. European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves, Marseille.
- Friedrich, A., G. Rademacher, A. Carlin and W. Klee (2009a). Ein aktuelles Problem: gehäuftes Vorkommen von hämorrhagischer Diathese bei jungen Kälbern. 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, Berlin, Vortragszusammenfassungen.
- Friedrich, A., G. Rademacher, K. B. Weber, E. Kappe, A. Carlin, A. Assad, C. Sauter-Louis, A. Hafner-Marx, M. Büttner, J. Böttcher and W. Klee (2009b). "Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarksschädigung bei jungen Kälbern." *Tierärztl. Umschau* 64: 423-431.
- Fröhlich, J. (2009). Shigatoxin-spezifische Immunglobuline und Ausscheidung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Kälbern.
- Garrett, E. F., E. Po, E. R. Bichi, S. K. Hexum, R. Melcher and A. M. Hubner (2015). "Clinical disease associated with epizootic hemorrhagic disease virus in cattle in Illinois." *J Am Vet Med Assoc* 247 (2): 190-195.
- Genestier, L., R. Paillot, N. Bonnefoy-Berard, G. Meffre, M. Flacher, D. Fevre, Y. J. Liu, P. Le Bouteiller, H. Waldmann, V. H. Engelhard, J. Banchereau and J. P. Revillard (1997). "Fas-independent apoptosis of activated T cells induced by antibodies to the HLA class I alpha1 domain." *Blood* 90 (9): 3629-3639.
- Ghevaert, C., D. A. Wilcox, J. Fang, K. L. Armour, M. R. Clark, W. H. Ouwehand and L. M. Williamson (2008). "Developing recombinant HPA-1a-specific antibodies with abrogated Fcgamma receptor binding for the treatment of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia." *J Clin Invest* 118 (8): 2929-2938.
- Gramatges, M. M., P. Fani, K. Nadeau, S. Pereira and M. R. Jeng (2009). "Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies." *Pediatr Blood Cancer* 53 (1): 97-99.
- Green, L. M., J. L. Reade and C. F. Ware (1984). "Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines." *J Immunol Methods* 70 (2): 257-268.
- Gruel, Y., B. Boizard, F. Daffos, F. Forestier, J. Caen and J. L. Wautier (1986). "Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus." *Blood* 68 (2): 488-492.

- Hagimoto, R., K. Koike, K. Sakashita, T. Ishida, Y. Nakazawa, Y. Kurokawa, T. Kamijo, S. Saito, A. Hiraoka, M. Kobayashi and A. Komiyama (2001). "A possible role for maternal HLA antibody in a case of alloimmune neonatal neutropenia." *Transfusion* 41 (5): 615-620.
- Harmeyer, S. S., A. F. G. Antonis, J. S. Salt and C. J. M. Bruschke (2005). "The comparative efficacy of commercially available BVDV vaccines in cattle challenged with European BVDV Type 1." *Res Vet Sci* 78 (Suppl 1): 15.
- Harms, M., T. Paepenmüller and C. C. Müller-Goymann (2008). Quillaja-Saponine als Immunadjuvantien. Retrieved 15/2008, from <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=5454>.
- Harrach, B., A. Bata, E. Bajmocy and M. Benko (1983). "Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis." *Appl Environ Microbiol* 45 (5): 1419-1422.
- Heald, K. A., T. R. Jay and R. Downing (1994). "Assessment of the reproducibility of alginate encapsulation of pancreatic islets using the MTT colorimetric assay." *Cell Transplant* 3 (4): 333-337.
- Henniger, P., T. Henniger, F. Seehusen, O. Distl and M. Ganter (2014). "Causes of death in calves with experimentally induced bovine neonatal pancytopenia (BNP)." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 127 (1-2): 61-69.
- Henniger, T., B. Schwert, P. Henniger, O. Distl and M. Ganter (2013). "[Renal function tests in milk fed calves--reference values and influence of bovine neonatal pancytopenia (BNP)]." *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 41 (6): 345-352.
- Herzenberg, L. A., D. W. Bianchi, J. Schroder, H. M. Cann and G. M. Iverson (1979). "Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (3): 1453-1455.
- Hoffmann-Fezer, G., R. Hoffmann and W. Hofmann (1974). "[Chronic furazolidone poisoning in the calf. 2. Studies on the bone marrow]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 81 (3): 59-63.
- Hofmann, W. (1972). "Hämorrhagische Diathese beim Kalb infolge chronischer Furazolidon-Vergiftung." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 79: 289-312.
- Hofmann, W., R. Hoffmann and G. Hoffmann-Fezer (1974). "[Chronic furazolidone poisoning in calves. I. Clinical, hematological and morphological studies]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 81 (3): 53-58.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Oxford, UK, Garland Science Publishing.
- Jaster, E. H. (2005). "Evaluation of quality, quantity, and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G1 absorption in Jersey calves." *J Dairy Sci* 88 (1): 296-302.
- Jones, B. A., C. Sauter-Louis, J. Henning, A. Stoll, M. Nielen, G. Van Schaik, A. Smolenaars, M. Schouten, I. den Uijl, C. Fourichon, R. Guatteo, A. Madouasse, S. Nusinovici, P. Deprez, S. De Vliegher, J. Laureyns, R. Booth, J. M. Cardwell

- and D. U. Pfeiffer (2013). "Calf-level factors associated with bovine neonatal pancytopenia--a multi-country case-control study." *PLoS One* 8 (12): e80619.
- Kaplan, C. (2006). "Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopaenia." *Orphanet J Rare Dis* 1: 39.
- Kaplan, C., C. Patereau, M. N. Reznikoff-Etievant, J. Y. Muller, Y. Dumez and A. Kessler (1985). "Antenatal PLA1 typing and detection of GP IIb-IIIa complex." *Br J Haematol* 60 (3): 586-588.
- Kappe, E. C., M. Y. Halami, B. Schade, M. Alex, D. Hoffmann, A. Gangl, K. Meyer, W. Dekant, B. A. Schwarz, R. John, J. Buitkamp, J. Bottcher and H. Muller (2010). "Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123 (1-2): 31-41.
- Kasonta, R., M. Holsteg, K. Duchow, J. W. Dekker, K. Cussler, J. G. Bendall and M. Bastian (2014). "Colostrum from cows immunized with a vaccine associated with bovine neonatal pancytopenia contains allo-antibodies that cross-react with human MHC-I molecules." *PLoS One* 9 (10): e109239.
- Kasonta, R., C. Sauter-Louis, M. Holsteg, K. Duchow, K. Cussler and M. Bastian (2012). "Effect of the vaccination scheme on PregSure((R))BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatal Pancytopenia." *Vaccine* 30 (47): 6649-6655.
- Kerner, K. (2012). *In vitro*-Evaluation von rekombinanten *E.coli* Shigatoxoiden als Impfstoffkandidaten für Rinder Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Kim, J. W. and F. W. Schmidt (1983). "[Absorption of colostral immunoglobulins by the calf]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 90 (7): 283-286.
- Klemm, A. (2010). "Auftreten von Boviner Neonataler Pancytopenie und begleitende hämatologische Untersuchungen bei Kälbern in einer 1.500er Milchviehanlage." *Tierärztl. Umschau* 65: 257-270.
- Koelewijn, J. M., T. G. Vrijkotte, C. E. van der Schoot, G. J. Bonsel and M. de Haas (2008). "Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands." *Transfusion* 48 (5): 941-952.
- König, M., L. Jöns-Anders, C. Förster, K. Failing, H.-P. Heckert and H.-J. Thiel (2006). "Impfung gegen BVD/MD: direkter Vergleich verschiedener Impfstoffe und Impfregime." *Tierärztl Prax Großtiere* 5 (34): 281-288.
- Kracke, A. (2011). "Wichtige Informationen zu PregSure® BVD und zur Bovinen Neonatalen Pancytopenie (BNP)." Serienbrief Pfizer vom 13.04.2011, Pfizer Tiergesundheit, Berlin
- Krappmann, K., R. Weikard, S. Gerst, C. Wolf and C. Kuhn (2010). "A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI." *Vet J* 190 (2): 225-229.

- Lambton, S. L., A. D. Colloff, R. P. Smith, G. L. Caldow, S. F. Scholes, K. Willoughby, F. Howie, J. Ellis-Iversen, G. David, A. J. Cook and A. Holliman (2012). "Factors associated with bovine neonatal pancytopenia (BNP) in calves: a case-control study." *PLoS One* 7 (5): e34183.
- Laming, E., E. Melzi, S. F. Scholes, M. Connelly, C. R. Bell, K. T. Ballingall, M. P. Dagleish, M. S. Rocchi and K. Willoughby (2012). "Demonstration of early functional compromise of bone marrow derived hematopoietic progenitor cells during bovine neonatal pancytopenia through in vitro culture of bone marrow biopsies." *BMC Res Notes* 5 (1): 599.
- Langford, G., S. G. Knott, C. K. Dimmock and P. Derrington (1971). "Haemolytic disease of newborn calves in a dairy herd in Queensland." *Aust Vet J* 47 (1): 1-4.
- Larson, B. L., H. L. Heary, Jr. and J. E. Devery (1980). "Immunoglobulin production and transport by the mammary gland." *J Dairy Sci* 63 (4): 665-671.
- Lascelles, A. K. (1979). "The immune system on the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis." *J Dairy Sci* 62 (1): 154-167.
- Lendemans, D. G., J. Myschik, S. Hook and T. Rades (2005). "Cationic cage-like complexes formed by DC-cholesterol, Quil-A, and phospholipid." *J Pharm Sci* 94 (8): 1794-1807.
- Lipp, K. (2005). Feldstudie zur kolostralen Immunglobulin-Versorgung neugeborener Kälber in Abhängigkeit von der Verweildauer beim Muttertier. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Lo, Y. M., E. S. Lo, N. Watson, L. Noakes, I. L. Sargent, B. Thilaganathan and J. S. Wainscoat (1996). "Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications." *Blood* 88 (11): 4390-4395.
- Lo, Y. M., P. Patel, M. Sampietro, M. D. Gillmer, K. A. Fleming and J. S. Wainscoat (1990). "Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood." *Lancet* 335 (8703): 1463-1464.
- Lock, E. A., Y. Sani, R. B. Moore, M. B. Finkelstein, M. W. Anders and A. A. Seawright (1996). "Bone marrow and renal injury associated with haloalkene cysteine conjugates in calves." *Arch Toxicol* 70 (10): 607-619.
- Loesch, U., J. Cihak, M. H. Erhard and B. Kaspers (2000). Blut und Abwehr. Physiologie der Haustiere. v. E. W. and B. G. Stuttgart, Enke im Hippokrates Verlag GmbH.
- Lövgren, K. and B. Morein (1988). "The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms)." *Biotechnol Appl Biochem* 10 (2): 161-172.
- MAF (2011). MAF Food Safety Recall of BVD Vaccine in New Zealand. from <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/bvd-vaccine-nz.htm>.
- Maheshwari, A., R. D. Christensen and D. A. Calhoun (2002). "Immune-mediated neutropenia in the neonate." *Acta Paediatr Suppl* 91 (438): 98-103.

- Makoschey, B., M. G. Janssen, M. P. Vrijenhoek, J. H. Korsten and P. Marel (2001). "An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2." *Vaccine* 19 (23-24): 3261-3268.
- Marin, L., A. Torio, M. Muro, R. Fernandez-Parra, A. Minguella, V. Bosch, M. R. Alvarez-Lopez and A. M. Garcia-Alonso (2005). "Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies." *Pediatr Allergy Immunol* 16 (3): 279-282.
- Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Bibrack and G. Wittmann (1977). *Virologische Arbeitsmethoden*. Stuttgart und New York, Gustav Fischer Verlag.
- McCoy, G. C., J. K. Reneau, A. G. Hunter and J. B. Williams (1970). "Effects of diet and time on blood serum proteins in the newborn calf." *J Dairy Sci* 53 (3): 358-362.
- Mehlhorn, H., V. Walldorf, S. Klimpel and G. Schmahl (2008). "Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe." *Parasitol Res* 103 Suppl 1: S79-86.
- Metzger, R., T. Mempel, I. Joppich and H. Till (2000). "Organ-specific distribution of major histocompatibility antigens in rats." *Pediatr Surg Int* 16 (4): 285-292.
- Mizuno, N. S., V. Perman, F. W. Bates, J. H. Sautter and M. O. Schultze (1959). "Life span of thrombocytes and erythrocytes in normal and thrombocytopenic calves." *Blood* 14 (6): 708-719.
- Mueller, K. E., C. N. Weber, J. Meyer and A. Gruber (2009). Monitoring of health and selected parameters of blood biochemistry and haematology in neonates and their dams on a farm with bovine haemorrhagic syndrome. . *European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis, Marseille*.
- Nagelkerke, J. F. and P. J. Boogaard (1991). "Nephrotoxicity of halogenated alkenyl cysteine-S-conjugates." *Life Sci* 49 (24): 1769-1776.
- Nayar, G. P., A. L. Hamel, L. Lin, C. Sachvie, E. Grudeski and G. Spearman (1999). "Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses." *Can Vet J* 40 (4): 277-278.
- Newby, T. J. and J. Bourne (1977). "The nature of the local immune system of the bovine mammary gland." *J Immunol* 118 (2): 461-465.
- Newby, T. J., C. R. Stokes and F. J. Bourne (1982). "Immunological activities of milk." *Vet Immunol Immunopathol* 3 (1-2): 67-94.
- Newman, M. J. and H. C. Hines (1979). "Production of foetally stimulated lymphocytotoxic antibodies by primiparous cows." *Anim Blood Groups Biochem Genet* 10 (2): 87-92.
- Newman, M. J. and H. C. Hines (1980). "Stimulation of maternal anti-lymphocyte antibodies by first gestation bovine fetuses." *J Reprod Fertil* 60 (1): 237-241.
- Osterhoff, D. R. and A. J. de Vos (1977). "Isoimmune blood group antibodies in cattle after the use of a blood vaccine." *J S Afr Vet Assoc* 48 (2): 137-139.

- Paantjens, A. W., E. A. van de Graaf, J. M. Kwakkel-van Erp, T. Hoefnagel, W. G. van Ginkel, F. Fakhry, D. A. van Kessel, J. M. van den Bosch and H. G. Otten (2011). "The Induction of IgM and IgG Antibodies against HLA or MICA after Lung Transplantation." *Pulm Med* 2011: 432169.
- Paape, M. J., D. D. Bannerman, X. Zhaob and J.-W. Leeb (2003). "The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk." *Vet Res* 34: 597-627.
- Pahlke, M. (2011). "Blutschwitzer: Impfstoff am Pranger." *dlz Agrarmagazin* 08/2011: 108-112.
- Pandey, V. S., A. Verhulst and F. Demey (1993). "Effect of low temperature storage on the haemolytic complement of cattle and sheep." *Vet Immunol Immunopathol* 37 (3-4): 337-341.
- Pardon, B., K. De Bleecker, L. Steukers, J. Dierick, V. Saey, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, R. Ducatelle and P. Deprez (2009a). Neonatal haemorrhagic diathesis in Belgium: Epidemiology. *European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves*, Marseille.
- Pardon, B., V. Saey, J. Dierick, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, R. Ducatelle, L. Steukers, K. De Bleecker and P. Deprez (2009b). Neonatal haemorrhagic diathesis in Belgium: Gross pathology of blood and the haematopoietic system. *European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves*, Marseille.
- Pardon, B., L. Steukers, J. Dierick, R. Ducatelle, V. Saey, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, J. Callens, K. De Bleecker and P. Deprez (2010). "Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: an emerging syndrome in Europe." *Transbound Emerg Dis* 57 (3): 135-146.
- Pardon, B., E. Stuyven, S. Stuyvaert, M. Hostens, J. Dewulf, B. M. Goddeeris, E. Cox and P. Deprez (2011). "Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes." *Vet Immunol Immunopathol* 141 (3-4): 293-300.
- Payne, R. (1962). "The development and persistence of leukoagglutinins in parous women." *Blood* 19: 411-424.
- Pellerin, C., J. van den Hurk, J. Lecomte and P. Tijssen (1994). "Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities." *Virology* 203 (2): 260-268.
- Pintado, C. O., M. Friend and D. Llanes (1995). "Characterisation of a membrane receptor on ruminants and equine platelets and peripheral blood leukocytes similar to the human integrin receptor glycoprotein IIb/IIIa (CD41/61)." *Vet Immunol Immunopathol* 44 (3-4): 359-368.
- Platt, R., C. Coutu, T. Meinert and J. A. Roth (2008). "Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhea virus vaccine in beef cattle." *Vet Immunol Immunopathol* 122 (1-2): 8-15.
- Polkes, A. C., S. Giguere, G. D. Lester and F. T. Bain (2008). "Factors associated with outcome in foals with neonatal isoerythrolysis (72 cases, 1988-2003)." *J Vet Intern Med* 22 (5): 1216-1222.

- Pollock, J. M. and J. M. Bowman (1990). "Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn." *Vox Sang* 59 (3): 176-179.
- Puri, S., D. C. Shieh, A. Canavan and K. J. Kao (1993). "Quantitation and characterization of plasma HLA in neonates of different gestational ages." *Tissue Antigens* 42 (2): 67-71.
- Rainard, P. (2003). "The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections." *Vet Res* 34 (5): 647-670.
- Raue, R., S. S. Harmeyer and I. A. Nanjiani (2010). "Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals." *Vet J* 187 (3): 330-334.
- Raue, R., S. S. Harmeyer and I. A. Nanjiani (2011). "Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals." *Vet J* 187 (3): 330-334.
- Regan, L., P. R. Braude and D. P. Hill (1991). "A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy." *Hum Reprod* 6 (2): 294-298.
- Reinicke, A. (2006). Vergleichende Fallbeschreibung zur kolostralen IgG-Versorgung neugeborener Kälber in zwei südkalifornischen Milchbetrieben mit unterschiedlichen Managementbedingungen., Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ridpath, J. F., S. R. Bolin and E. J. Dubovi (1994). "Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes." *Virology* 205 (1): 66-74.
- Roberts, I., S. Stanworth and N. A. Murray (2008). "Thrombocytopenia in the neonate." *Blood Rev* 22 (4): 173-186.
- Roddy, M., M. Clemente, E. D. Poggio, R. Bukowski, S. Thakkar, G. Waxenecker, H. Loibner, G. Himmler, D. E. Hricik and P. S. Heeger (2005). "Heterogeneous alterations in human alloimmunity associated with immunization." *Transplantation* 80 (3): 297-302.
- Rosenberger, J. K. and S. S. Cloud (1998). "Chicken anemia virus." *Poult Sci* 77 (8): 1190-1192.
- Rossow, N. (1995). Anämien. Innere Medizin für Tierärzte. Stuttgart, Ulmer: 74 ff.
- Salmon, H. (1999). "The mammary gland and neonate mucosal immunity." *Vet Immunol Immunopathol* 72 (1-2): 143-155.
- Salt, J. S., A. F. G. Antonis, A. R. Peters, A. Brune, S. Jahnecke, W. Traeder and S. S. Harmeyer (2004). "PregSure® BVD - eine neue inaktivierte BVD-Vakzine. Breite Kreuzneutralisation von europäischen BVDV-Typ-1- und Typ-2-Stämmen und signifikante Verbesserung der Fertilität nach Testinfektionen." *Tierärztl Prax (G)* 32 (4): 191-195.

- Sanchez-Miguel, C., M. McElroy and E. Walsh (2010). "Bovine neonatal pancytopenia in calves in Ireland." *Vet Rec* 166 (21): 664.
- Sarvašová, A., M. Goffredo, I. Sopoliga, G. Savini and A. Kočišová (2014). "Culicoides midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of orbiviruses in Slovakia " *Veterinaria Italiana* 50 (3): 203-212.
- Saunders, C. N. and D. A. Kinch (1968). "Thrombocytopenic purpura of pigs." *J Comp Pathol* 78 (4): 513-523.
- Sauter-Louis, C., A. Carlin, A. Friedrich, A. Assad, F. Reichmann, G. Rademacher, C. Heuer and W. Klee (2012). "Case control study to investigate risk factors for bovine neonatal pancytopenia (BNP) in young calves in southern Germany." *Prev Vet Med* 105 (1-2): 49-58.
- Savini, G., A. Afonso, P. Mellor, I. Aradaib, H. Yadin, M. Sanaa, W. Wilson, F. Monaco and M. Domingo (2011). "Epizootic haemorrhagic disease." *Res Vet Sci* 91 (1): 1-17.
- Schmidt, U., G. Trautwein, B. Hertrampf, H. Erhard and H. H. Fiedler (1977). "Thrombozytopenische Purpura beim Saugferkel. Morphologische, hämatologische und serologische Untersuchungen." *Zentralblatt Veterinärmedizin B* 24: 386-397.
- Scholes, S. (2009). Haemopoietic cell depletion and regeneration in calves with idiopathic haemorrhagic diathesis syndrome. European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves, Marseille.
- Schroeder, M. E., D. J. Johnson, E. N. Ostlund, J. Meier, M. A. Bounpheng and A. Clavijo (2013). "Development and performance evaluation of a streamlined method for nucleic acid purification, denaturation, and multiplex detection of Bluetongue virus and Epizootic hemorrhagic disease virus." *J Vet Diagn Invest* 25 (6): 709-719.
- Schröter, P., H. Kuiper, M. Holsteg, C. Puff, L. Haas, W. Baumgärtner, M. Ganter and O. Dist (2011). "Reproduzierbarkeit der bovinen neonatalen Pancytopenie (BNP) über die Verabreichung von Kolostrum." *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124: 390-400.
- Schultze, M. O., P. Klubes, V. Perman, N. S. Mizuno, F. W. Bates and J. H. Sautter (1959). "Blood dyscrasia in calves induced by S-(dichlorovinyl)-L-cysteine." *Blood* 14: 1015-1025.
- Schumann, D. (2011). Bovine neonatale Pancytopenie: Laborexperimentelle Untersuchungen im Rahmen der Ursachenforschung. Inaugural-Dissertation, Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schütt, C. and B. Bröker (2011). *Grundwissen Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sharma, R. P. (1993). "Immunotoxicity of mycotoxins." *J Dairy Sci* 76 (3): 892-897.
- Shimazaki, T., S. Nakamura, K. Taguchi and Y. Inoue (2003). "Efficacy of bovine viral diarrhea vaccine used in Japan against bovine viral diarrhea virus type 2 strain 890." *J Vet Med Sci* 65 (2): 263-266.

- Shope, R. E., L. G. Macnamara and R. Mangold (1960). "A Virus-Induced Epizootic Hemorrhagic Disease Of The Virginia White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*).¹" *J Exp Med* 111 (2): 155-170.
- Simpson, J. L. and S. Elias (1993). "Isolating fetal cells from maternal blood. Advances in prenatal diagnosis through molecular technology." *Jama* 270 (19): 2357-2361.
- Sjölander, A., B. van't Land and K. Lovgren Bengtsson (1997). "Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses." *Cell Immunol* 177 (1): 69-76.
- Skene, C. D. and P. Sutton (2006). "Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use." *Methods* 40 (1): 53-59.
- Skov, S., S. Bregenholt and M. H. Claesson (1997). "MHC class I ligation of human T cells activates the ZAP70 and p56lck tyrosine kinases, leads to an alternative phenotype of the TCR/CD3 zeta-chain, and induces apoptosis." *J Immunol* 158 (7): 3189-3196.
- Smolenaars, A. J. G. and M. H. Mars (2009). Epidemiological and diagnostic results of haemorrhagic disease syndrome in calves in the Netherlands. European Buiatrics Forum 2009: Satellite Symposium on Haemorrhagic Diathesis in Calves, Marseille.
- Snook, C. (2001). Update on Neonatal Isoerythrolysis, International Veterinary Information Service (www.ivis.org)
- Steficek, B. A., J. S. Thomas, J. C. Baker and T. G. Bell (1993a). "Hemorrhagic diathesis associated with a hereditary platelet disorder in Simmental cattle." *J Vet Diagn Invest* 5 (2): 202-207.
- Steficek, B. A., J. S. Thomas, M. F. McConnell and T. G. Bell (1993b). "A primary platelet disorder of consanguineous simmental cattle." *Thromb Res* 72 (2): 145-153.
- Stöber, M. (2002). Hämorrhagische Diathesen. Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. G. Dirksen, H.-D. Gründer and M. Stöber. Parey, Berlin. 4: 247-253.
- Stoffregen, B., S. R. Bolin, J. F. Ridpath and J. Pohlenz (2000). "Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case." *Vet Microbiol* 77 (1-2): 157-162.
- Stormont, C. (1975). "Neonatal isoerythrolysis in domestic animals: a comparative review." *Adv Vet Sci Comp Med* 19: 23-45.
- Stormorken, H., R. Svenkerud, P. Slagsvold and H. Lie (1963). "Thrombocytopenic bleedings in young pigs due to maternal isoimmunization." *Nature* 198: 1116-1117.
- Stott, G. H., D. B. Marx, B. E. Menefee and G. T. Nightengale (1979). "Colostrum immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption." *J Dairy Sci* 62 (10): 1632-1638.

- Stott, G. H., D. B. Marx, B. E. Menefee and G. T. Nightengale (1979). "Colostrum immunoglobulin transfer in calves II. The rate of absorption." *J Dairy Sci* 62 (11): 1766-1773.
- Stout, R. D., C. Jiang, B. Matta, I. Tietzel, S. K. Watkins and J. Suttles (2005). "Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences." *J Immunol* 175 (1): 342-349.
- Sun, H. X., Y. Xie and Y. P. Ye (2009). "Advances in saponin-based adjuvants." *Vaccine* 27 (12): 1787-1796.
- Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto (1986). "An improved colorimetric assay for interleukin 2." *J Immunol Methods* 93 (2): 157-165.
- Terasaki, P. I., M. R. Mickey, J. N. Yamazaki and D. Vredevoe (1970). "Maternal-fetal incompatibility. I. Incidence of HL-A antibodies and possible association with congenital anomalies." *Transplantation* 9 (6): 538-543.
- Theilen, G. H., J. D. Rush, W. A. Nelson-Rees, D. L. Dungworth, R. J. Munn and J. W. Switzer (1968). "Bovine leukemia: establishment and morphologic characterization of continuous cell suspension culture, BL-1." *J Natl Cancer Inst* 40 (4): 737-749.
- Thomas, M. R., R. Williamson, I. Craft, N. Yazdani and C. H. Rodeck (1994). "Y chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy." *Lancet* 343 (8894): 413-414.
- Tischer, I., L. Bode, J. Apodaca, H. Timm, D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli and E. Gerike (1995). "Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle." *Arch Virol* 140 (8): 1427-1439.
- Tizard, I. R. (1996). *Veterinary Immunology, An Introduction*, W.B. Saunders.
- Todd, D. (2000). "Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review." *Avian Pathol* 29 (5): 373-394.
- Tomicic, M., M. Starcevic, J. Bux, V. Zach, Z. Hundric-Haspl, V. Drazic and B. Grahovac (2003). "Severe neonatal neutropenia due to anti-human leucocyte antigen B49 alloimmunization only: a case report." *Transfus Med* 13 (4): 233-237.
- Traub-Dargatz, J. L., J. J. McClure, C. Koch and J. W. Schlipf, Jr. (1995). "Neonatal isoerythrolysis in mule foals." *J Am Vet Med Assoc* 206 (1): 67-70.
- Turner, C. P. and A. G. Hadley (2003). "The role of P-selectin in the immune destruction of platelets." *Br J Haematol* 121 (4): 623-631.
- Valli, V. E. O. (2007). Hematopoietic system. . Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. M. G. Maxie. Amsterdam, Elsevier. 5: 107-324.
- van Dam, R. H., C. Borst-Vanwerkhoven, J. A. van der Donk and J. Goudswaard (1976). "Histocompatibility in ruminants - the production and evaluation of allo-antibodies for GL-A typing in goats " *J Immunogenet* 3 (4): 237-244.

- van Engeland, M., L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte and C. P. Reutelingsperger (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." *Cytometry* 31 (1): 1-9.
- Van Rood, J. J., J. G. Eernisse and A. Van Leeuwen (1958). "Leucocyte antibodies in sera from pregnant women." *Nature* 181 (4625): 1735-1736.
- Vasseur, E., J. Rushen and A. M. de Passille (2009). "Does a calf's motivation to ingest colostrum depend on time since birth, calf vigor, or provision of heat?" *J Dairy Sci* 92 (8): 3915-3921.
- Vaxjo (Aufgerufen am 21.03.2013). Quil-A vaccine adjuvant, University of Michigan Medical School.
- Viarouge, C., E. Breard, S. Zientara, D. Vitour and C. Sailleau (2015). "Duplex Real-Time RT-PCR Assays for the Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus." *PLoS One* 10 (7): e0132540.
- Vilcek, S., D. J. Paton, B. Durkovic, L. Strojny, G. Ibata, A. Moussa, A. Loitsch, W. Rossmann, S. Vega, M. T. Scicluna and V. Paifi (2001). "Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups." *Arch Virol* 146 (1): 99-115.
- Waite, D. C., E. W. Jacobson, F. A. Ennis, R. Edelman, B. White, R. Kammer, C. Anderson and C. R. Kensil (2001). "Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21." *Vaccine* 19 (28-29): 3957-3967.
- Walknowska, J., F. A. Conte and M. M. Grumbach (1969). "Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer." *Lancet* 1 (7606): 1119-1122.
- Walz, P. H., T. G. Bell, B. A. Steficek, L. Kaiser, R. K. Maes and J. C. Baker (1999). "Experimental model of type II bovine viral diarrhoea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves." *J Vet Diagn Invest* 11 (6): 505-514.
- Warwick, R. M., J. Vaughan, N. Murray, A. Lubenko and I. Roberts (1994). "In vitro culture of colony forming unit-megakaryocyte (CFU-MK) in fetal alloimmune thrombocytopenia." *Br J Haematol* 88 (4): 874-877.
- Weiss, D. J. and L. G. Adams (1987). "Aplastic anemia associated with trimethoprim-sulfadiazine and fenbendazole administration in a dog." *J Am Vet Med Assoc* 191 (9): 1119-1120.
- Weiss, D. J. and J. S. Klausner (1990). "Drug-associated aplastic anemia in dogs: eight cases (1984-1988)." *J Am Vet Med Assoc* 196 (3): 472-475.
- White, K., T. Rades, P. Kearns, I. Toth and S. Hook (2006). "Immunogenicity of liposomes containing lipid core peptides and the adjuvant Quil A." *Pharm Res* 23 (7): 1473-1481.
- Wiener, E., O. Abeyakoon, G. Benchetrit, M. Lyall, T. Keler and C. H. Rodeck (2003). "Anti-HPA-1a-mediated platelet phagocytosis by monocytes in vitro and its inhibition by Fc gamma receptor (FcgammaR) reactive reagents." *Eur J Haematol* 70 (2): 67-74.

-
- Wiesner, E. and R. Ribbeck (2000). Lexikon der Veterinärmedizin. Stuttgart, Enke im Hippokrates Verlag GmbH.
- Williams, M. R., D. M. Cauvi, I. Rivera, D. Hawisher and A. De Maio (2016). "Changes in macrophage function modulated by the lipid environment." *Innate Immun* 22 (3): 141-151.
- Willoughby, K., J. Gilray, M. Maley, A. Dastjerdi, F. Steinbach, M. Banks, S. Scholes, F. Howie, A. Holliman, P. Baird and J. McKillen (2010). "Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia." *Vet Rec* 166 (14): 436-437.
- Witt, K., C. N. Weber, J. Meyer, S. Buchheit-Renko and K. E. Muller (2011). "Haematological analysis of calves with bovine neonatal pancytopenia." *Vet Rec* 169 (9): 228.
- Wolfmeyer, A., G. Wolf, M. Beer, W. Strube, H. R. Hehnen, N. Schmeer and O. R. Kaaden (1997). "Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates." *Arch Virol* 142 (10): 2049-2057.
- Woodle, E. S., D. M. Smith, J. A. Bluestone, W. M. Kirkman, 3rd, D. R. Green and E. W. Skowronski (1997). "Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway." *J Immunol* 158 (5): 2156-2164.
- Yeruham, I., Y. Avidar, S. Harrus, L. Fishman and I. Aroch (2003). "Immune-mediated thrombocytopenia and putative haemolytic anaemia associated with a polyvalent botulism vaccination in a cow." *Vet Rec* 153 (16): 502-504.
- Zupanska, B., M. Uhrynowska, K. Guz, K. Maslanka, E. Brojer, M. Czestynska and I. Radomska (2001). "The risk of antibody formation against HNA1a and HNA1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia." *Transfus Med* 11 (5): 377-382.

Anhang

Verwendete Reagenzien und Materialien

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Materialien

Artikel / Reagenz	Bezugsquelle	Artikelnummer
Accutase®	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	L11-007
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	A9400
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt	1.01145
Annexin V FITC Assay Kit	AbD Serotec, Düsseldorf	ANNEX300F
Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	k. A.
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V, pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	K-41-001
Combitips plus (2,5 ml, 5ml)	Eppendorf AG, Hamburg	0030048.016 0030069.250
CryoTubes™ (1,8 ml)	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold	343958
CFSE	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	ALX-610-030-M025
3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	M2128
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Menzel-Gläser, über MAGV GmbH, Rabenau	k. A.
D-(+)-Glucose (wasserfrei)	Merck KGaA, Darmstadt	8337
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	D2650
Einmal-Sterilfilter (0,22 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	P 6661
	Fortsetzung nächste Seite	

Artikel / Reagenz	Bezugsquelle	Artikelnummer
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht	55.1579.002
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare über Fisher Scientific GmbH, Schwerte	17-1440-02
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	DAB-061238
37 % ige Formaldehydlösung	Merck KGaA, Darmstadt	1.04002.1000
Gebrauchsfertige Filtereinheit Rotrand FP 30/0,2 CA-S	Whatman® über MAGV GmbH, Rabenau	10462200
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	9105
IMDM (ohne Phenolrot)	Invitrogen GmbH, Darmstadt	k. A.
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt	4936.1000
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	4873
Leibovitz's L-15-Medium	Invitrogen GmbH, Darmstadt	41300
MDBK-Zellen	Institut für Virologie, JLU Gießen	ATCC® Nr.: CCL-22™
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	M7522
Meerschweinchen-Komplement	Siemens Healthcare, Marburg	ORAY15
Microwell-Platten, 96 Loch, V- Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhäusen	651101
Microwell-Platten, 96 Loch, Flachboden	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold	167008
Natriumazid (NaN ₃)	Merck KGaA, Darmstadt	645
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	6345
	Fortsetzung nächste Seite	

Artikel / Reagenz	Bezugsquelle	Artikelnummer
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3957.2
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt	6323
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	P11-010
Petrischalen 92 x 16 mm	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe	09-031-0060
Petrischalen 60 mm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	628161
Pipettenspitzen blau (100-1000 µl)	Ratiolab GmbH, Dreieich	2100611
Pipettenspitzen gelb (10-100 µl)	Ratiolab GmbH, Dreieich	2100601
Pipettenspitzen kristall (0,5-10 µl)	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe	07-812-0000
Pipettenspitzen Mehrkanal (200 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	2090610
Plastik-Einmal-Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	760180 (25 ml), 607180 (10 ml), 606180 (5 ml)
Plastik-Einmal-Pipetten (1 ml)	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold	159609
Polypropylenröhrchen CELLSTAR® (15 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	188261
Polypropylenröhrchen CELLSTAR® (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	227261
RPMI 1640 Medium (mit 2 mM stab. L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO ₃)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P04-18500
	Fortsetzung nächste Seite	

Artikel / Reagenz	Bezugsquelle	Artikelnummer
Reaktionsgefäß (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg	0030120.086
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt	1.00319.2500
Straußkanüle, 1,8 x 43 mm	Medigro GmbH, Mainhausen	k. A.
Superblockpuffer in PBS	Perbio Science Deutschland, Bonn, Deutschland	0037515
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	2326.2
Trypanblau	Dr. G. Grübler & Co., Leipzig	k. A.
Trypsin (10x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	L-11-001
Vorfilter Millex® AP20	Millipore über MAGV GmbH, Rabenau	
VueLife® Zellkulturbeutel (Volumen 25 ml)	Südlaborbedarf GmbH, Gauting	32FL05
Zellkulturflaschen (T-75,T-25)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	658175 (T-75) 690175 (T-25)

Verwendete Puffer, Medien und Lösungen

7-AAD-Lösung

7-AAD	1 mg
DMSO	1 ml

Anzuchtmedium für Mø (1,5 % Amphotericin B)

IMDM (ohne Phenolrot)	77,5 ml
FKS	20 ml
Amphotericin B	1,5 ml
Penicillin (10.000 IE/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	1 ml
β-Mercaptoethanol (100 mM)	50 µl

BSA-Lösung

BSA	1 g
PBS-Puffer	100 ml

BL-3-Medium

RPMI 1640 (mit stabilisiertem Glutamin)	62 ml
L-15-Medium	27 ml
FKS	10 ml
Penicillin (10.000 IE/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	1 ml

Erythrozyten-Lyse-Reagenz

NH ₄ Cl	8,26 g
NaHCO ₃	1,09 g
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	0,037 g
<i>A. bidest</i>	ad 1.000 ml

HEPES-10-fach-Konzentrat (pH 7,4)

NaCl	40 g
KCl	1,5 g
HEPES	11,9 g
D-Glucose (wasserfrei)	10 g
<i>A. bidest.</i>	ad 500ml

HEPES-Puffer (pH 7,4)

HEPES-10-fach-Konzentrat	50 ml
<i>A. bidest</i>	ad 500 ml

Kultivierungsmedium für Mø

IMDM (ohne Phenolrot)	465 ml
FKS	25 ml
Penicillin (10.000 IE/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	5 ml
Amphotericin B	5 ml
β-Mercaptoethanol (100 mM)	0,25 ml

L-15-Medium (Leibovitz)

Leibovitz's-L-15-Medium	1,39 g
<i>A. bidest</i>	100 ml

NaCl-Lösung

NaCl	8,9 g
<i>A. bidest</i>	ad 1.000 ml

NaN₃-Lösung (10 %)

NaN ₃	5 g
NaCl-Lösung (0,89 %)	50 ml

2-Mercaptoethanol-Lösung (1 mM)

2-Mercaptoethanol (14,3 M)	7 µl
<i>A. bidest</i>	100 ml

MTT-Stammlösung (5 mg/ml)

MTT	0,5 g
PBS-Puffer	100 ml

PBS-Puffer (pH 7,4)

PBS-10-fach-Konzentrat	100 ml
<i>A. bidest</i>	ad 1.000 ml

PBS-10-fach-Konzentrat (pH 7,4)

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	18,0 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
KCl	2,5 g
NaCl	100,0 g
<i>A. bidest</i>	ad 1.000 ml

PBS-EDTA-Puffer (pH 7,4)

PBS-EDTA-10-fach-Konzentrat	100 ml
<i>A. bidest</i>	ad 1.000 ml

PBS-EDTA-10-fach-Konzentrat (pH 7,4)

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	14,2 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	20,0 g
KCl	2,0 g
NaCl	80,0 g
<i>A. bidest</i>	ad 1.000 ml

RPMI-1640-Medium (mit 10 % FKS und 1 %**Penicillin/Streptomycin)**

RPMI 1640 (mit stabilisiertem Glutamin)	445 ml
FKS	50 ml
Penicillin (10.000 IE/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	5 ml

SDS-Lösung (10 %-ig, 0,01n HCl)

Na-Dodecylsulfat	50 g
HCl 1N	5 ml
<i>A. bidest</i>	450 ml

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,2 g
NaCl-Lösung (0,89 %)	ad 1.000 ml

Trypsin-Gebrauchslösung

Trypsin	100 ml
HEPES-Puffer mit 0,1 % EDTA	900 ml

Waschlösung

PBS-Puffer	100 ml
NaN ₃ -Lösung (10 %)	100 µl

BL-3-Waschlösung

PBS-Puffer	100 ml
BSA-Lösung	1 ml
NaN ₃	100 µl

Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank Typ BB 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Eismaschine Scotsman AF 80AS	Scotsman Icesystems, Vernon Hills, USA
elektrische Pumpe, easy-load Masterflex®	Millipore GmbH, Eschborn
FACSCalibur™-Gerät	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage AE 163	Mettler-Waagen, Gießen
Feinwaage Bosch PE 625	Feinwaagenfabrik Bosch, Jungingen
Gefrierschrank economic-froster GSL 3512 (-20°C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe,
Gefrierschrank -70°C	k. A.
Inversmikroskop Labovert FS	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Kühlschrank Bosch Automatic	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Magnetrührer IKA COMBIMAG RET	Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, Staufen
Microprocessor pH-Meter pH537	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mehrkanalpipette mLine® 100 (5-100 ml)	Biohit GmbH, Rosbach
Multistepper	Labsystems GmbH, Meckenheim
Neubauer Zählkammer, improved, hell-linig	über MAGV GmbH, Rabenau
Pipetten BioHit mLine®10 (0,5-10 ml), mLine®100 (10-100 ml), mLine®1000 (100-1000 ml)	Biohit GmbH, Rosbach
Plattenphotometer Titertek Multiscan Ascent	Labsystems GmbH, Meckenheim
Sicherheitswerkbank Microflow S1424/1	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
	Fortsetzung nächste Seite

Gerät	Firma
Sterilbank LaminAir HB 2472	Heraeus Instruments, Hanau
Spiegel Titertek TM , Microtitration equipment	Flow Laboratories,
Tischkühlzentrifuge 4K15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Vortex-Gerät REAX 1	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, über MAGV GmbH, Rabenau
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wippe	Eigenbau der Institutswerkstatt

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die beprobten Betriebe.....	57
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Spenderkälber	59
Tabelle 3: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Antikörper	61
Tabelle 4: Korrelationskoeffizienten für den Vergleich von Allo-AK-Titern, die mit verschiedenen Testzellen ermittelt wurden	95
Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten für den Vergleich von Allo-AK-Titern, die mit verschiedenen Testzellen ermittelt wurden, und den SLA-Titern.....	96
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Materialien	172

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DFZM-Allo-AK _{Leuko} -Test: Auswertstrategie und Analyse für den Nachweis von Alloantikörpern mit bovinen Leukozyten als Testantigen.....	69
Abbildung 2: DFZM-Allo-AK _{MDBK} -Test und DFZM-Allo-AK _{BL-3} -Test: Auswertstrategie und Analyse für den Nachweis von Alloantikörpern mit MDBK- bzw. BL-3-Zellen als Testantigen.	70
Abbildung 3: DFZM-Allo-AK _{Thrombo} -Test : Auswertstrategie und Analyse für den Nachweis von Alloantikörpern mit bovinen Thrombozyten als Testantigen.	71
Abbildung 4: Dosisabhängige Zytotoxizität einer Serumprobe gegenüber MDBK-Zellen (Ergebnisse des MTT-Tests; Beispiel mit log ₁₀ -Serumverdünnungsreihe).....	76
Abbildung 5: Auswertung des Apoptose- und Nekrosetests mittels Durchflusszytometrie.....	81
Abbildung 6: Auswert- und Analysestrategie bei der Auswertung des Phagozytose-Tests	88
Abbildung 7: Ablesbare Kennwerte in den Box-Whisker-Plots.	89
Abbildung 8: Korrelation zwischen den Allo-AK-Titern, die mit Leukozyten von 2 verschiedenen Spenderkälbern ermittelt wurden (Spenderkälber 2 und 3).....	93
Abbildung 9: Alloantikörper in Serumproben von Kühen in 6 rinderhaltenden Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus.....	99
Abbildung 10: Alloantikörper in Serumproben von Kühen in 6 rinderhaltenden Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus.	100
Abbildung 11: Allo-AK-Titer von BNP-Müttern und Nicht-BNP-Müttern in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B.....	102
Abbildung 12: Allo-AK-Titer von BNP-Müttern und Nicht-BNP-Müttern in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben A und B.....	103
Abbildung 13: Anteil Allo-AK-positiver Kühe in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben in Abhängigkeit von der Altersgruppe.	105
Abbildung 14: Korrelationen zwischen BVDV-Titern und DFZM-Allo-AK _{Lympho} -Titern bei Kühen in den 4 BVDV-Impfbetrieben.	107
Abbildung 15: Alloantikörper in Serumproben von Kühen in 6 rinderhaltenden Betrieben mit unterschiedlichem BVDV-Impfstatus.	109

Abbildung 16: Allo-AK-Titer in korrespondierenden Serum- und Kolostrumproben aus PregSure® BVD-geimpften Kühen und Kontrollkühen.....	110
Abbildung 17: Vitalität von MDBK-Zellen nach Inkubation mit Rinderserumproben mit [A] und ohne [B] Komplementzusatz.	113
Abbildung 18: Zytotoxische Aktivität der untersuchten Serumproben (n = 83).....	114
Abbildung 19: Korrelation zwischen der Komplement-abhängigen Zytotoxizität und dem Allo-AK-Titer von Rinderserumproben.....	115
Abbildung 20: Anteile apoptotischer und nekrotischer MDBK-Zellen nach der Einwirkung von Rinderserumproben.	117
Abbildung 21: Einfluss von Rinderserumproben auf die Zytophagozytose von BL-3-Zellen durch Makrophagen.....	119
Abbildung 22: Bindung der MHC I-spezifischen monoklonalen Antikörper IL-A88 [A] und W6/32 [B] an mit Alloantikörpern vorinkubierte MDBK-Zellen.....	121
Abbildung 23: Titer der Alloantikörper in Rinderserumproben nach Immunglobulinklassen bzw. -subtypen.....	123

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt den Angehörigen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rolf Bauerfeind. Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind danke ich für die Bereitstellung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung des Promotionsvorhabens. Seine Ideen und Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei meinen Betreuern Herrn Philip Bridger, Ph.D., Frau Dr. Simone Schillinger und Frau Dr. Katharina Kerner bedanke ich mich für die engagierte Betreuung sowie die unermüdliche Unterstützung, die weit über das übliche Maß hinausging. Frau Ursula Leidner danke ich für die Einführung in die Arbeit im Zellkulturlabor, ihre große Hilfsbereitschaft und exzellente Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Desweiteren möchte ich mich bei allen anderen Kolleginnen und Kollegen im Verbundprojekt „Ursachenermittlung der bei Kälbern auftretenden Hämorrhagischen Diathese (Bovine Neonatale Panzytopenie)“, insbesondere Prof. Dr. Klaus Doll, Dr. Julia Franke und Frau Susanne Doppmeier aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine sowie Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel, Prof. Dr. Tillmann Rümenapf und Dr. Fabian Deutszens aus dem Institut für Virologie der JLU Gießen, für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Den Mitarbeitern der AG Biomathematik und Datenverarbeitung, insbesondere Herrn Dr. Klaus Failing, danke ich für die kompetente Beratung und engagierte Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer und Frau Prof. Dr. Ewers danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Aufnahme in das Institut.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Betriebsleitern der im Rahmen dieser Arbeit beprobten Milchviehbetriebe für ihre Aufgeschlossenheit gegenüber wissenschaftlicher Arbeit und ihre bereitwillige Zusammenarbeit bei der Gewinnung des Probenmaterials. Ein großer Dank gilt allen Mit-Doktorandinnen und Mit-Doktoranden. Die gegenseitige Unterstützung und der Zusammenhalt waren wirklich außergewöhnlich. Ich werde diese Zeit nie vergessen. Ein herzlicher Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiter/innen des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Dem Stiftungsausschuss Graduiertenförderung der JLU Gießen und der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Julian bedanke ich mich für die Hilfe bei diversen technischen Problemen sowie sein großes Verständnis und den seelischen Rückhalt auch in schwierigen Phasen. Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung und auch für die

Ablenkung zur rechten Zeit. Mein größter Dank gilt meinen Eltern Irmgard und Thomas Beyer, die mich immer unterstützt, an mich geglaubt und mich gefördert haben und mir so das Studium und die Doktorarbeit ermöglicht haben.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Monika Mewes-Beyer



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6753-3



9 783835 196753